

# **Die Entwicklung eines halbwertszeitverlängerten Albumins**

## **Dissertation**

zur  
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

Dem Fachbereich Pharmazie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Philipp Claar**  
aus Wittelsberg

Marburg/Lahn 2011

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation  
angenommen

am 01.11.2011

Erstgutachter: Prof. Dr. Keusgen

Zweitgutachter: Prof. Dr. Bakowsky

Tag der mündlichen Prüfung am 02.11.2011

Meinen Eltern, meiner Schwester und Nora

“I have often said that when you can measure  
what you are speaking about  
and can express it in numbers  
you know something about it;  
when you can not express it in numbers,  
your knowledge is in meager and unsatisfactory kind;  
it may be the beginning of knowledge,  
but you have scarcely in your thoughts,  
advanced to the state of science,  
whatever the matter will be.”

Lord Kelvin (1834-1907)

## Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Keusgen für die Übernahme meiner Betreuung und Annahme des Dissertationsthemas und die ständige Unterstützung und Hilfestellung von ihm und seiner Arbeitsgruppe in zahlreichen Sitzungen. Herr Prof. Dr. Keusgen war über den gesamten Zeitraum immer eine Quelle von zielführenden Ideen und ein guter Motivator.

Herrn Prof. Dr. Bakowski. danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferates. Außerdem danke ich den Mitgliedern meiner Prüfungskommission, Herrn Prof. Dr. Kuschinsky und Herrn Prof. Dr. Li.

Ich danke meinen Arbeitskollegen der Firma CSL Behring, die mich in allen Belangen unterstützt und mir industrielle Arbeitsweisen näher gebracht haben, ebenso wie der Arbeitsgruppe des Fachbereichs Pharmazie.

Herrn Dr. Schulte, Herrn Prof. Dr. Dickneite, Herrn Beltz und Herrn Lind danke ich für die wissenschaftliche Hilfestellung und die experimentellen Vorschläge als wegweisende Orientierung. Bei Herbert Dersch möchte ich mich für die Hilfestellung bei gentechnischen Arbeiten bedanken. Sabrina, Stefan, Steffi, Thomas R., Elke, Martina, Sibylle und Thomas P. danke ich für die Unterstützung bei Fragen die Zellkultivierung betreffend. Sonja, Antje und Kathi danke ich für Ihre Unterstützung bei der Proteinaufreinigung. Jo, Jörg, Walli und Anke möchte ich für ihre Unterstützung bei ELISA- und SPR-Analysen danken. Hartmut und Tanja danke ich für den Materialsupport. Meinen Mitstreitern Daniel und Michael möchte ich für die fachlichen Diskussionen aller Art danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Weimer, der mich als mein Betreuer im Labor fachlich und menschlich hervorragend durch meine Promotion begleitet hat.

Besonders danke ich meinen Eltern, meiner Schwester und meiner Freundin Nora ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.



## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	7
Abkürzungsverzeichnis .....	14
1 Einleitung.....	20
1.1 Albumin .....	20
1.1.1 Struktur von Albumin .....	20
1.1.2 Die Synthese von Albumin .....	22
1.1.3 Die Funktion von Albumin .....	23
1.1.4 Der Abbau von Albumin .....	23
1.2 Der neonatale Fc-Rezeptor .....	25
1.2.1 Struktur .....	25
1.2.2 Die Entdeckung und die Funktion des FcRn.....	26
1.2.3 Die Bindung von FcRn an IgG.....	28
1.2.4 Der Recyclingmechanismus von IgG durch FcRn .....	28
1.3 Die Bindung zwischen Albumin und dem neonatalen Fc-Rezeptor.....	29
1.3.1 Der Einfluss des FcRn auf die Halbwertszeit von Albumin .....	31
1.4 Ziel der Arbeit.....	32
1.4.1 Motivation für die Entwicklung eines halbwertszeitverlängerten Albumins..	
.....	32
1.4.2 Die Identifikation der Bindestelle zwischen FcRn und Albumin.....	34
1.5 Vorgehen .....	35
1.5.1.1 Bioinformatische Analysen zur Eingrenzung potentieller Bindestellen	
von Albumin zu FcRn (Hofmann K., 2007) .....	35
1.5.1.2 Experimentelles Vorgehen zur Eingrenzung potentieller Bindestellen	
auf eine Aminosäure oder Aminosäuresequenz.....	38
1.5.1.3 Mögliche Ergebnisse aus den analytischen Experimenten und deren	
Interpretation .....	38
1.5.2 Punktmutationen einzelner Aminosäuren .....	39
1.5.2.1 Bioinformatische Analysen zur Substitution einzelner Aminosäuren	
(Hofmann K., 2009) .....	40

1.5.3	Experimentelle Umsetzung und mögliche Ergebnisse der Substitution einzelner Aminosäuren.....	40
2	Material und Methoden .....	42
2.1	Gentechnische Methoden .....	42
2.1.1	Die Polymerasekettenreaktion.....	42
2.1.1.1	Die „nested“ Polymerasekettenreaktion.....	43
2.1.1.1	Die „touchdown“ Polymerasekettenreaktion .....	43
2.1.1.2	Die Mutagenese PCR .....	44
2.1.2	Restriktionsenzyme.....	44
2.1.3	Agarosegelelektrophorese .....	45
2.1.4	Isolierung von DNA Fragmenten aus Agarosegel und das „PCR-KIT 250“ .....	46
2.1.5	Das System pCR4 Topo.....	46
2.1.6	Klenow fill in blunting kit NEB .....	47
2.1.7	Ligation von DNA .....	47
2.1.8	Transformation .....	47
2.1.8.1	Plasmidamplifikation <i>in vivo</i> , <i>Escherichia. Coli</i> Kultivierungsbedingungen.....	48
2.1.9	Einzelklonselektion.....	48
2.1.10	Aufreinigung von Plasmid DNA (Qiagen Kit 8 Vakuum tube).....	49
2.1.11	DNA Sequenzierung .....	49
2.2	Zellkulturtechnische Methoden .....	49
2.2.1	Verwendete Zelllinien und deren Kultivierung.....	49
2.2.2	Transfektion von DNA in HEK-und CHO-Zellen .....	50
2.2.3	Die Produktion rekombinanter Proteine im Zellkultur-Fermenter .....	51
2.3	Methoden zur Proteinaufreinigung .....	54
2.3.1	Auftauen und Filtrieren des Zellkulturüberstandes.....	54
2.3.2	Ankonzentrierung von Überständen .....	54
2.3.3	Chromatographie .....	54
2.3.3.1	Metallchelat Affinitätschromatographie.....	55
2.3.3.1	Immunoaffinitätschromatographie .....	55
2.4	Proteinanalytische Methoden .....	56
2.4.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ..	56
2.4.2	Westernblott.....	57



2.4.3	Enzyme Linked Immunosorbent Assay ELISA .....	57
2.4.4	CD-Spektren und Schmelzpunktanalyse .....	57
2.4.1	Schmelzpunktanalyse .....	58
2.5	Methoden zur Bestimmung von Bindungen .....	59
2.5.1	Die Oberflächen-Plasmonen-Resonanzspektroskopie .....	59
2.5.1.1	Immobilisierung von Proteinen an Dextranfäden .....	60
2.5.1.2	Die Assoziation und Dissoziation von Proteinen .....	60
2.5.1.3	Berechnung von Bindungskinetiken .....	61
2.5.2	Tierversuche .....	63
2.5.2.1	Applikation von Proteinen und Probennahme .....	63
2.5.2.2	Die Berechnung der Halbwertszeit Wiederfindungsrate, Bioverfügbarkeit und der Eliminationsgeschwindigkeitskonstante .....	64
3	Ergebnisse .....	67
3.1	Gentechnische Arbeiten .....	67
3.1.1	Herstellung alanisierter rekombinanter Albuminvarianten .....	67
3.1.1.1	Die Vorbereitung des Klonierungsvektors .....	68
3.1.1.2	Mutagenesen von Albumin, Einbringung von Schnittstellen .....	70
3.1.1.3	Die Einbringung der Alanin kodierenden Oligonukleotide .....	73
3.1.1.4	Die Herstellung einer Punktmutation am Beispiel des Albuminklons 1815 74	
3.1.1.5	Das Umklonieren von Albuminen in andere Expressionssysteme ...	75
3.1.2	Herstellung punktmutierter Albuminvarianten .....	77
3.1.3	Klonierung des humanen neonatalen Fc-Rezeptors .....	79
3.1.3.1	Isolierung der cDNA humanen FcRn und des $\beta$ -2 Mikroglobulins aus einer cDNA Bank .....	79
3.1.3.2	Die Markierung des FcRn durch einen His-tag .....	81
3.1.3.3	Einbringung des neonatalen Fc-Rezeptors in Expressionsplasmide	82
3.2	Zellkulturtechnische Arbeiten .....	83
3.2.1	Die Expression der Albuminklone .....	83
3.2.1.1	Expression der Albuminvarianten in HEK .....	83
3.2.1.2	Expression der Albuminvarianten in CHO .....	84
3.2.2	Expression des neonatalen Fc-Rezeptors in CHO .....	85
3.2.3	Aufbau der Seedtrains .....	87
3.2.4	Fermentation .....	89

3.3	Aufreinigung von Albumin und FcRn .....	92
3.3.1	Aufreinigung von Albumin .....	92
3.3.1.1	Ankonzentrierung von Überständen mittels Diafiltration .....	92
3.3.1.2	Affinitätschromatographie von Albuminvariante 1954.....	93
3.3.1.3	Reinigungsanalytik von Albuminklon 1954 .....	95
3.3.1.4	Überprüfung auf Fragmente im Western Blot .....	97
3.3.1.5	Die aufgereinigten Albumine in der Übersicht.....	98
3.3.2	Aufreinigung des neonatalen Fc-Rezeptors.....	99
3.3.2.1	His-tag Affinitätschromatographie von Zellkulturüberstand einer FcRn Produktion .....	99
3.3.2.2	Reinigungsanalytik des FcRn .....	100
3.3.2.3	Ankonzentrierung der Eluate im Zentrifugenfilter.....	101
3.3.2.4	Bestimmung der hergestellten Masse an FcRn .....	102
3.4	Pharmakokinetiken in der Ratte .....	103
3.4.1	Abbaukinetik alanisierter Albumine in der Ratte .....	103
3.4.2	Abbaukinetik punktmutierter Albumine in der Ratte .....	112
3.5	SPR Bindungsstudien .....	119
3.5.1	Elektrostatiken FcRn und rHA .....	119
3.5.2	Immobilisierung von FcRn und Albumin am CM3 Chip.....	119
3.5.3	Funktionstest von FcRn im Hinblick auf eine Bindung mit IgG und HSA.... .....	121
3.5.4	Referenz für Albuminmutanten an FcRn und umgekehrt.....	124
3.5.4.1	Erstellung von Bindungskinetiken am Beispiel Albumin Wildtyp ....	126
3.5.5	Erstellung von Bindungskinetiken alanisierter rekombinanter Albumine .... .....	129
3.5.6	Erstellung von Bindungskinetiken punktmutierter rekombinanter Albumine .....	135
3.6	Circular dichroismus-Spektroskopie .....	139
3.6.1	CD-Spektren und Schmelzkurven alanisierter Albumine und des Albumin Wildtyps.....	140
3.6.1.1	CD-Spektrum und Schmelzkurve des Albumin Wildtyps.....	140
3.6.1.1	CD-Spektrum und Schmelzkurve der Albuminvariante 1815 .....	142
3.6.1.2	CD-Spektrum und Schmelzkurve der Albuminvariante 1798 .....	144
3.6.1.3	CD-Spektrum und Schmelzkurve der Albuminvariante 1954 .....	146
3.6.2	Schmelzkurven punktmutierter Albumine und des Wildtyp Albumins....	148

3.6.2.1	CD-Spektrum und Schmelzkurve des punktmutierten Albumins	2129
	.....	148
3.6.2.2	CD-Spektrum und Schmelzkurve des punktmutierten Albumins	1853
	.....	150
4	Diskussion	152
4.1	Die Etablierung eines Testsystems	152
4.1.1	Die Expression eines löslichen humanen FcRn	152
4.1.2	Die Expression von Albuminmutanten	153
4.1.3	Die Etablierung eines SPR-Bindungsassays von FcRn zu Albumin	155
4.2	Die Untersuchung der Bindestelle von Albumin an den FcRn	156
4.2.1	Der Ausschluß zahlreicher Aminosäuren im Albumin als potentielle Bindestelle zum FcRn	157
4.2.2	Die Eingrenzung der Bindestelle von Albumin an FcRn auf zwei Aminosäuresequenzen	160
4.2.3	Die Feinanalyse von punktmutierten Albuminen	161
4.2.4	Eine mögliche Bindestelle von Albumin zu FcRn	162
4.2.5	Die potentielle Bindestelle in der Aminosäuresequenz KATKE	163
4.2.6	Gleichzeitige Forschungen anderer Arbeitsgruppen	164
4.3	Ausblick in zukünftige Forschungen	168
5	Zusammenfassung	170
6	Literaturverzeichnis	171
7	Anhang	182
7.1	Verwendete Chemikalien, Geräte und Materialien	182
7.1.1	Material zur Durchführung einer Polymerasekettenreaktion	182
7.1.2	Material zur Durchführung einer Mutagenese	183
7.1.3	Material zur Durchführung von Agarosegelelektrophoresen	184
7.1.4	Material zur Durchführung anderer Gentechnischer Arbeiten	185
7.1.5	Material zur Durchführung Zellkulturtechnischer Arbeiten	187
7.1.6	Material zur Durchführung von Proteinaufreinigungen	189
7.1.1	Material zur Proteinanalytik	190
7.1.1.1	SDS-PAGE	190

7.1.1.2	SDS-PAGE Silberfärbereagenzien.....	190
7.1.1.3	Western Blotts.....	191
7.1.1.4	ELISA.....	192
7.1.1.5	CD-Spektrenanalyse .....	193
7.1.1.6	SPR .....	193
7.1.1.7	Material zu Tierversuchen .....	194
7.2	Bioinformatische Untersuchungen, Sequenzvergleich der dritten Albumin Domäne diverser Spezies.....	195
7.3	Für Klonierungen und Mutagenesen verwendete Oligonukleotide.....	198
7.4	Klonnummern und deren Mutationen im Albumin .....	201
7.5	Genkarten von verwendeten Vektoren .....	203
7.5.1	Das Expressionsplasmid pIRES puro 3 (BD Biosciences).....	203
7.5.2	Das Expressionssystem pMARES neo.....	204
7.5.3	Der Klonierungsvektor pCR4 Topo (Invitrogen).....	204
7.6	Gelbilder .....	205
7.6.1.1	Agarosegelbilder zu Kapitel 3.1.1.2.....	205
7.7	Graphen und Tabellen zur Fermentation.....	208
7.7.1	Bilanzierung der exemplarisch dargestellten Fermentation des Klons 1954 .....	208
7.7.1.1	Verlauf des pH Wertes während der Fermentation des Albuminklons 1954 .....	210
7.7.1.2	Wachstumsraten .....	211
7.7.1.3	Glukoseverbrauch und Laktatbildung .....	212
7.7.1.4	Glutaminverbrauch, Glutamat- und Ammoniumbildung .....	213
7.8	Graphen zu Abbaukinetiken in der Ratte.....	214
7.8.1	Graphen zu alaninisierten Albuminen.....	214
7.9	Graphen zur surface plasmon resonance.....	243
7.9.1	Graphen zu den Elektrostatiken .....	243
7.9.2	Immobilisierung von Albumin am CM3 Chip .....	245
7.9.3	Graphen zur Berechnungen der Kinetiken IgG in der mobilen Phase an gekoppeltem FcRn .....	246
7.9.4	HSA in der mobilen Phase an gekoppeltem FcRn zur Berechnung von Kinetiken.....	247
7.9.5	Die alaninisierten Albumin Mutanten 1796,1797,1800,1801 zeigen in Ihrem Bindungsverhalten eine starke Ähnlichkeit zu dem des wildtyp Albumins	248

7.9.6	Punktmutierte Albumine am SPR.....	252
7.9.7	Zusammenfassung aller erstellten Kinetiken von Albuminen am FcRn.....	255

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Ak</b>	<b>Antikörper</b>
<b>AP</b>	alkalische Phosphatase
<b>AUC</b>	<i>area under curve</i> (Fläche unter der Kurve) bezogen auf die Bioverfügbarkeit [h ng/mL]
<b>AS</b>	Aminosäure
<b>BSA</b>	Bovines Serumalbumin
<b>Bsp</b>	Beispiel
<b>bp</b>	Basenpaare
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>CD</b>	Circulardichroismus
<b>cDNA</b>	<i>Complementary DNA</i>
<b>CHO</b>	Chinese hamster ovary
<b>Da</b>	Dalton
<b>ddNTP</b>	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
<b>dNTP</b>	Desoxyribonukleosidtriphosphat

<b>e</b>	eulersche Zahl $e = 2,718281828459...$
<b>EDC</b>	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
<b>et al.</b>	et alia (und weitere)
<b>Fa</b>	Firma
<b>Fc</b>	kristallisierbares Fragment
<b>FCS</b>	<i>Foetal calf serum</i> fötales Kälberserum
<b>FcRn</b>	Neonataler Fc-Rezeptor
<b>g</b>	Gramm
<b>Glu</b>	Glutaminsäure
<b>HEK</b>	Human embryonal kidney
<b>HEPES</b>	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Chromatography
<b>HRP</b>	Horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase
<b>HSA</b>	Humanes Serum Albumin

<b>IE</b>	Internationale Einheit
<b>IgG</b>	Immunglobulin G
<b>iP</b>	Isoelektrischer Punkt
<b>ITC</b>	Isothermale Titrations Kalorimetrie
<b>k</b>	Kilo-
<b>k<sub>a</sub></b>	Assoziationskonstante [ $M^{-1} s^{-1}$ ]
<b>k<sub>d</sub></b>	Dissoziationskonstante [ $s^{-1}$ ]
<b>k<sub>e</sub></b>	Eliminationsgeschwindigkeitskonstante [ $s^{-1}$ ]
<b>K<sub>A</sub></b>	Gleichgewichtskonstante der Assoziation (Affinitätskonstante) [ $M^{-1}$ ]
<b>K<sub>D</sub></b>	Gleichgewichtskonstante der Dissoziation [M]
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>k. A.</b>	keine Angabe
<b>kB</b>	Kilobase
<b>L</b>	Liter
<b>LB</b>	<i>Lysogeny broth</i> (Eigenname wörtl. aufgelöste Brühe)
<b>μ</b>	Mikro-
<b>M</b>	Konzentration c [mol/l]



<b>m</b>	Milli-
<b>MES</b>	2-Morpholino-ethansulfonsäure
<b>MHC</b>	<i>Major histocompatibility complex</i>
<b>min</b>	Minute
<b>mg</b>	Milligramm
<b>mRNA</b>	messenger RNA, Boten-RNA
<b>MW</b>	molecluar weight, Molekulargewicht
<b>n</b>	Nano-, Stoffmenge [mol]
<b>NC</b>	Nitrocellulose
<b>NHS</b>	N-Hydroxysuccinimid
<b>nm</b>	Nanometer
<b>NTA</b>	Nitrilotriessigsäure
<b>p</b>	Pico-
<b>PAGE</b>	Polyacrylamidgelelektrophorese
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline
<b>PCR</b>	Polymerasekettenreaktion
<b>Primer</b>	Oligonukleotid zum Starten einer PCR Reaktion

<b>PVDF</b>	Polyvinylidenfluorid
<b>rFVIIa</b>	Rekombinanter Blutgerinnungsfaktor VII aktiviert
<b>rFVIIa-FP</b>	Rekombinanter Blutgerinnungsfaktor VII aktiviert, als Albuminfusionsprotein vorliegend
<b>rFIXa-FP</b>	Rekombinanter Blutgerinnungsfaktor IX aktiviert, als Albuminfusionsprotein vorliegend
<b>rHA</b>	Rekombinantes Humanalbumin
<b>R<sub>0</sub></b>	<i>Initial response</i>
<b>R<sub>t</sub></b>	<i>Relative response</i>
<b>R<sub>max</sub></b>	<i>Maximum response</i>
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>RU</b>	<i>Refraction Unit</i> , Brechungsindex
<b>SDS</b>	Sodiumdodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
<b>Sec.</b>	Sekunden
<b>SK</b>	Schüttelkolben
<b>SPR</b>	<i>Surface Plasmon</i> Resonanz Spektroskopie
<b>t</b>	<i>Time</i> (Zeit)

---

<b>TA</b>	<i>Annealing</i> temperature
<b>U</b>	Units
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>U/min</b>	Umdrehungen pro Minute
<b>wt</b>	Wildtyp

# 1 Einleitung

## 1.1 Albumin

Im Jahr 1839 beschrieb Professor Ancell aus London ein lebenswichtiges Protein im menschlichen Körper wie folgt:

„Albumin ist zweifelsohne eines der wichtigsten, mit der Tierwelt eng verwandten Grundbestandteile des Menschen. Es kommt nicht nur im Serum des Blutes, sondern auch in der Lymphe, dem *Chylus*, in Ausdünstungen der Haut, in Flüssigkeiten des Zellgewebes, in flüssigen und festen Bestandteilen des Auges und in vielen anderen Körperflüssigkeiten vor. Albumin agiert manchmal als Säure und manchmal als Base, seine Widerstandsfähigkeit und Haltbarkeit ist so hoch, dass sein Vorkommen im Verhältnis zum Körpergewicht in nahezu allen höheren Lebensformen unabhängig von Geschlecht und Alter gleich ist“ (Ancell H., 1839).

Demnach existiert bereits seit über 170 Jahren eine relativ präzise Beschreibung von Albumin.

### 1.1.1 Struktur von Albumin

Serumalbumin gehört heute zu den am besten untersuchten Proteinen. Es besteht aus einer einzelnen Kette von 586 Aminosäuren im Menschen, bei anderen Arten sind es zwischen 585 und 590 Aminosäuren (Meloun B. 1975), (Brown J. R., 1975) Albumin ist nicht enzymatisch glykosiliert, jedoch können an bestimmten Aminosäuren einzelne Glukosereste gebunden sein, häufig an Lys 525 (Flückinger N. 1986). Bei der Zusammensetzung der Aminosäurekette fallen folgende Besonderheiten auf: Es ist sehr wenig Tryptophan (1-2 AS) und wenig Methionin (4-6 AS) enthalten. Dagegen sind geladene Aminosäuren häufig vertreten, wie z. Bsp. Glutamin- und Asparaginsäure, Lysin und Arginin. (Behrens P. G., 1975) Die Sekundärstruktur von Albumin ist eine einzigartige Abfolge  $\alpha$ -helikaler Strukturen zusammengehalten von Disulfidbrücken. Humanalbumin besitzt neun  $\alpha$ -helikale Schleifen, die sich in einem Triplet wiederholen, AS 1-190, AS 191-382 und AS 383-586 (Rosenoer VM. 1977). Nicht nur die Größe der drei Domänen ist nahezu identisch, auch die Aminosäureabfolgen sind sich ähnlich. Die Aminosäuresequenz der ersten und zweiten

Domäne sind zu 26 Prozent identisch, die der zweiten und dritten Domäne zu 20 Prozent, und die der ersten und dritten Domäne zu 18 Prozent (Ohno S. 1981), (Sargent T. D., 1981). Es besteht daher Grund zur Annahme, dass die drei Domänen durch Vervielfältigung aus einem ursprünglichen Globulin-Gen entstanden sind (McLachlan A. D., 1977), (Jagodzinski L. L., 1981).

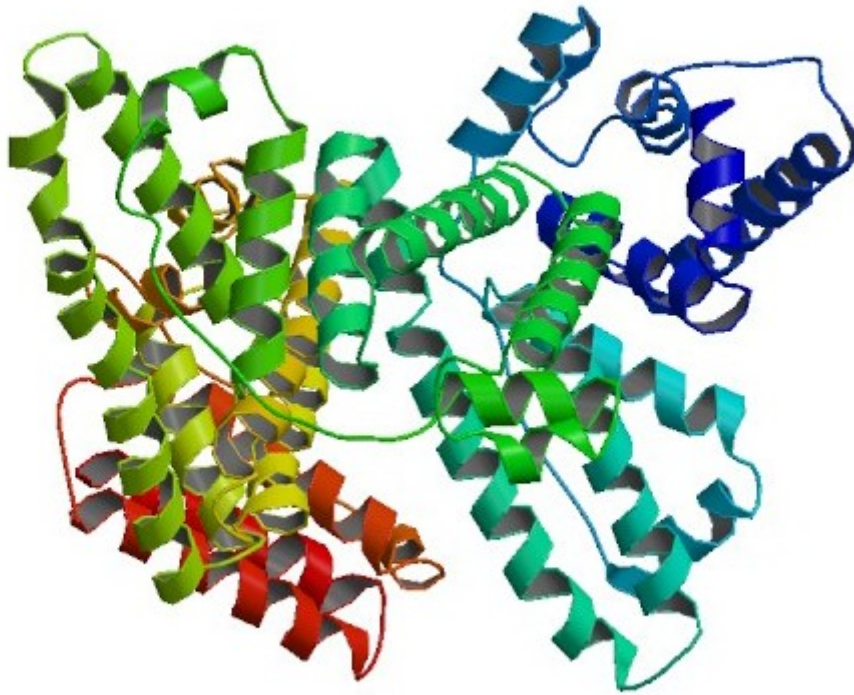
Vergleiche von Albuminen codierender mRNAs unterschiedlicher Spezies haben ergeben, dass diese Vervielfältigung vor 70 Millionen Jahren stattgefunden haben könnte (May F. 1983).

Albumin wird bis heute im industriellen Großmaßstab durch die „Cohn Fraktionierung“ aus Serum gewonnen, ein Verfahren, welches auf der Kryofällung unter der Zugabe von Ethanol basiert (Cohn E. J., 1944). Rekombinant hergestelltes Albumin existiert ebenfalls; es dient aber primär zu Forschungszwecken und kann mit preiswert hergestelltem Serumalbumin wirtschaftlich nur schwer konkurrieren (Sleep D., 1990).

Albumin ist sehr gut löslich; Lösungen von bis zu 30 Prozent sind in der Serologie üblich; sein isoelektrischer Punkt liegt im sauren Milieu. Weil unzählige Liganden an Albumin binden, fällt es schwer diesen genau zu bestimmen. Man geht von einem iP von 4,8 unter praktischen Bedingungen aus, da nahezu immer Fettsäuren an Albumin gebunden sind. Entfettete Proben kommen auf einen iP von 5,28 (MacKay M. E., 1957).

Albumin denaturiert nicht allzu schnell; Albuminlösungen können in Gegenwart von Stabilisatoren bis auf 60°C erwärmt werden, um potentielle Pathogene abzutöten (Neurath H. 1954).

Die erste Röntgenstrukturanalyse von Albumin wurde bereits 1992 erfolgreich durchgeführt; sie bot als dreidimensionales Bild einen detaillierten Einblick in Struktur des Albumins und lieferte die Grundlage für die Aufklärung zahlreicher Eigenschaften von Albumin.(Xiao Min He 1992). Zahlreiche weitere Kristallisationen von Albumin folgten (Sugio S. 1999).



**Abb. 1.1:**  
**Röntgenstrukturbild von Serum Albumin. (Sugio S. 1999)**

In dem in Abb. 1.1 dargestellten Röntgenstrukturbild sind die drei Domänen des Albumins in den Farben blau, rot und grün zu erkennen; die stark  $\alpha$ -helikale Faltung ist in einer Spiralform angedeutet.

### **1.1.2 Die Synthese von Albumin**

Serumalbumin wird in der Leber synthetisiert. Der direkte Nachweis des Syntheseortes wurde bereits 1950 durch Gewebepreparationen und durch die Pionierarbeit einer isolierten perfusionierten Rattenleber erbracht. Zahlreiche immunozytochemische Studien mit Peroxidase markierten anti-Albumin-Antikörpern haben die Synthese von Albumin in allen Hepatocyten bewiesen. Ein *de novo* synthetisiertes Albumin verbleibt zu posttranslationalen Prozessen im Durchschnitt zwanzig Minuten innerhalb der Hepatocyte, bevor es diese verlässt (Peters T. 1950).

Der Serumalbumin-Spiegel resultiert aus einer Verflechtung von drei aktiven physiologischen Prozessen: Der Synthese und der Abgabe von der Hepatocyte und des Abbaus des Albumins. In einem erwachsenen Menschen hat Albumin eine Halbwertszeit von 19 Tagen. Die Konzentration von Albumin im Serum beträgt im Durchschnitt 42 g/L; der Albuminspiegel ist nicht konstant, er kann von vielen Stoffen, z. B. Hormonen beeinflusst werden (Haeberli A. 1992).

### **1.1.3 Die Funktion von Albumin**

Albumin hat im Wesentlichen zwei Funktionen: Eine physiologische und eine biologische. Die physiologische Aufgabe von Albumin besteht darin, den kolloidosmotischen Druck im Plasma aufrecht zu erhalten, Albumin ist zu 80 Prozent dafür verantwortlich.

Außerdem reguliert es als einziges Protein die Balance von Säure und Base im Plasma und ist so der Puffer des Plasmas (Vallner J. J., 1977).

Durch Traumata, Infektionen und Krankheiten kann die Ausschüttung von Albumin gesteigert werden, um Hypalbuminämie entgegen zu wirken. Die biologische Funktion von Albumin ist die eines Trägerproteins für Fettsäuren, Prostaglandin, Hömatin, Thyroxin, zweiwertigem Kupfer, Cystein und Pyridoxalphosphat. Weiter bindet es etwas schwächer Calcium, steroide Hormone, Tryptophan, Bilirubin und zahlreiche andere Stoffe (Kragh-Hansen U. 1981) (Wood M. 1986).

### **1.1.4 Der Abbau von Albumin**

Ein 70 kg schwerer Erwachsener baut jeden Tag 14 Gramm Albumin ab. Albumin wird in nahezu jedem Organ abgebaut. Durch Versuche mit radioaktiv markiertem Albumin, welches Hasen appliziert wurde, konnte ein Abbau der applizierten Dosis von 40-60% in Haut- und Muskelgewebe nachgewiesen werden. In der Leber werden dagegen gerade einmal 15% des Albumins abgebaut; gemessen an der hohen Stoffwechselrate von Proteinen in der Leber ist das eher wenig. Durch die Nieren werden nur 10% des Albumins abgebaut, weitere 10% durchdringen die Magenschleimhaut und verlassen den Körper über den Gastroenteraltrakt (Yedgar S. 1983).

Der Abbaumechanismus von Albumin erfolgt über eine Aufnahme desselben in endozytotische Vesikel, die im Endothel mit einem Lysosom verschmelzen und das Albumin durch diverse Hydrolasen bei einem pH Wert von fünf abbauen (Schnitzer JE. 1993). Die Aufnahme von Albumin ins Endosom ist möglicherweise rezeptorvermittelt; in Frage kommen dafür „high density“ Lipoproteinrezeptoren, die auf zahlreichen Geweben vorhanden sind. Verursacht wird diese Bindung wohl durch Modifikation am Albumin.

Die Aufnahme von Fettsäuren durch Albumin schützt dieses vor Abbau, möglicherweise gerade vor dem endosomalen Abbauweg, indem es die Bindung an „high density“ Lipoproteinrezeptoren inhibiert (Peters TJ. 1996).

Ein weiterer Rezeptor, der die Aufnahme von Albumin ins Endosom vermutlich vermittelt und womöglich den Abbau von Albumin bei saurem pH im Lysosom inhibiert, ist der neonatale Fc Rezeptor (Chaudhury C 2003).



## 1.2 Der neonatale Fc-Rezeptor

Der neonatale Fc-Rezeptor ist ein membranständiges Glykoprotein, welches hauptsächlich im Endothel zahlreicher Organe exprimiert wird und auf deren Oberfläche verankert ist.

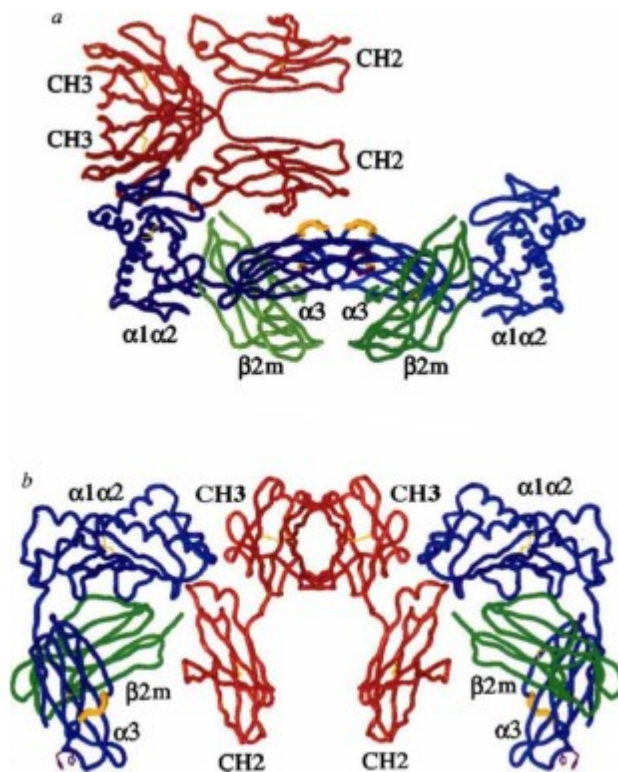


Abb. 1.2:

Röntgestrukturbild vom FcRn mit IgG aus der Ratte. (Burmeister W. 1994)

### 1.2.1 Struktur

Der FcRn ist der Gruppe *MHC* Klasse 1 des Immunsystems zuzuordnen. Er weist dessen typische Struktur von einer schweren Kette auf, die stark  $\alpha$ -helikal gefaltet ist eine *sandwich* Form bildet und auf einer Immunglobulin Domäne sitzt. Der reife FcRn besteht aus 265 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 39 kDa. An den FcRn ist eine aus 119 Aminosäuren bestehende und 13 kDa schwere Untereinheit nicht kovalent gebunden, das  $\beta$ -2 Mikroglobulin. Eine Bildung von Hetero- wie auch Homodimeren des FcRn kann erfolgen (s. Abb. 1.2) und hat einen Einfluss auf dessen Affinität zu IgG.

Eine erste umfassende Strukturaufklärung gelang 1994 mit einer Röntgenstrukturanalyse eines aus der Ratte isolierten FcRn (Burmeister W. 1994).

### **1.2.2 Die Entdeckung und die Funktion des FcRn**

Bereits 1892 beschrieb Paul Ehrlich in der Deutschen Medizinischen Wochenschrift in dem Artikel: „Bemerkungen über die Immunität durch Vererbung und Säugung“ eine Immunisierung des Säuglings über die Muttermilch (Ehrlich P., 1892). Im Jahr 1972 wurde erstmals ein auf Rezeptoren basierender Mechanismus über die Aufnahme von Antikörpern, die über die Muttermilch gegeben und über den Gastrointestinaltrakt aufgenommen wurden, am Beispiel von Ratten beschrieben (Jones E. A., 1972).

Erst 1996 wurde der die Funktion des FcRn als ein im Syncytiotrophoblast der humanen Plazenta exprimierter Rezeptor, der IgG transportiert, beschrieben (Leach J. L., 1996). Der Transport von IgG erfolgt beim Menschen pränatal. Dabei wird IgG an einem Syncytiotrophoblast endosomatisch aufgenommen und bindet im azidifizierten Endosom an den auf dessen Oberfläche verankerten FcRn. Die Bindung löst sich erst wieder, nachdem sich das Endosom auf der foetalen Seite des Syncytiotrophoblasts geöffnet hat und physiologischer pH herrscht (Simister N. E., 1996) und (Kristoffersen 1996). Der Transport von IgG bei Nagetieren erfolgt dagegen postnatal, indem der über die Muttermilch aufgenommene Antikörper des Typs IgG durch einen auf der Enterocyte in das Intestinal Lumen präsentierten FcRn gebunden wird. Die Bindung von FcRn und IgG ist dabei durch den sauren pH im intestinalen lumen initiiert und findet außerhalb des Endosoms statt; die Bindung löst sich auch hier durch den physiologischen pH Wert im Blut des gesäugten Nagers (Simister N. E., 1985).

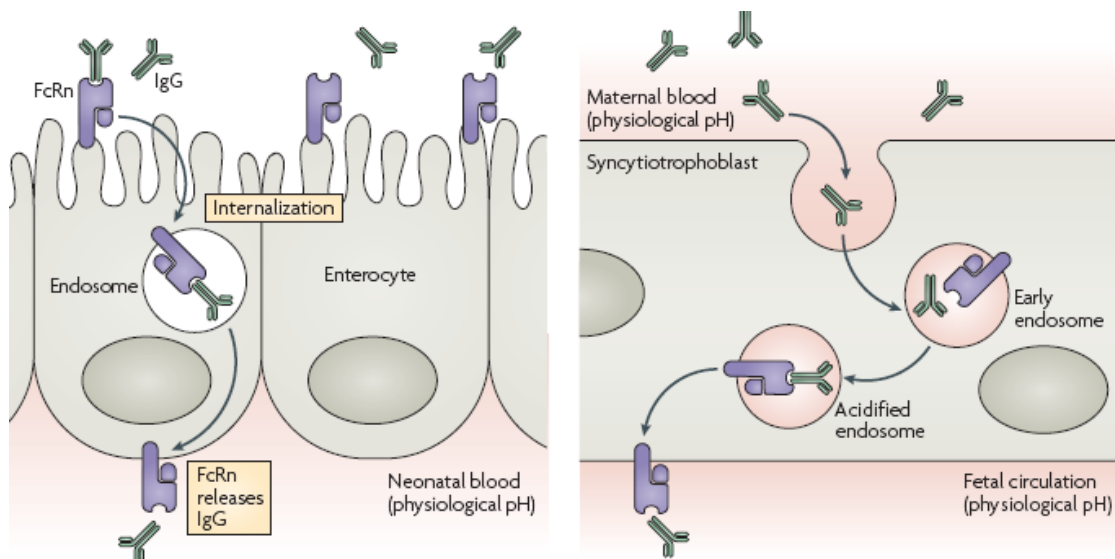


Abb. 1.3:

**Schematische Zeichnung des FcRn vermittelten IgG Transports durch eine Enterocyte eines Neugeborenen (links), schematische Zeichnung des FcRn vermittelten IgG Transports durch den Syncytiotrophoblast von der Mutter zum Fötus (rechts), (Roopenian D. C. 2007 )**

Nicht zuletzt auf Grund der vielen Orte der Expression des FcRn werden zahlreiche mögliche Funktionen in Abhängigkeit von dem Organ und der Gewebeart des Vorkommens des FcRn postuliert.

Der FcRn wird im zentralen Nervensystem stark exprimiert. Ihm wird dort die Funktion eines Entzündungshemmers postuliert. Im Fall einer Bakteriämie würden Antikörper vom Typ IgG durch den FcRn vermittelt wieder zurück in die Blutbahn gelangen. So wurde zum Beispiel in einem Mausmodell für Alzheimer, nach der Injektion eines speziellen Antikörpers gegen durch Alzheimer, verursachte *Plaques* der Antikörper im Blutkreislauf wiedergefunden, bei einer zur Kontrolle eingesetzten FcRn *knockout* Maus dagegen nicht (Ballabh P. B., 2004).

Eine weitere postulierte Funktion des FcRn ist seiner starken Expression auf Epithelzellen der Lunge geschuldet; er soll dort über die Luft aufgenommene Antikörper in die Blutbahn transferieren können (Dumont J. A., 2005).

Neben einer reinigenden Funktion der Glomeruli der Niere von größeren Antikörper-Antigen Komplexen, durch einen Rücktransport dieser in die Blutbahn wird dem FcRn auch ein Recyclingmechanismus von IgG und Albumin zugeschrieben (Low, S. C. 2005).

### 1.2.3 Die Bindung von FcRn an IgG

Die Bindung zwischen FcRn und IgG erfolgt pH abhängig: Der FcRn bindet an IgG bei physiologischem pH nicht; bei leicht saurem pH von 6-6,5 dagegen hat der FcRn eine Affinität zur Fc-Region von IgG. Durch die Bindung an IgG erfährt der FcRn keine nennenswerte Änderung der Konformation (Vaughn D E., 1998). Die stark vom pH abhängige Bindung ist nicht abhängig von der Konformation; sie ist bedingt durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, von Wasserstoffatomen, die erst durch die Protonierung von Histidinen eine dazu notwendige Ladung erhalten. An der Bindung sind die beiden Histidine an Stelle 310 und 345 der Sequenz des IgG beteiligt (Raghavan M. 1995). Wie bereits anhand von Bindungsversuchen durch SPR und bei einer Alanisierung dieser beiden Aminosäuren gezeigt werden konnte, gehen diese Bindungen mit den Glutaminsäuren an Stelle 117, 132 und 135 sowie der Asparaginsäure an Stelle 137 des FcRn ein (Vaughn D E., 1997). Die Zahl und Art der an dieser Bindung von Seiten des IgG beteiligten Aminosäuren variiert abhängig von der Spezies und des Isotyps des IgG (Ghetie V., 2000).

### 1.2.4 Der Recyclingmechanismus von IgG durch FcRn

Der FcRn wird auf zahlreichen verschiedenen Geweben exprimiert, nirgendwo jedoch so stark wie am Gefäßendothel; hier besetzt er eine große Oberfläche auf der er Kontakt zu Blut und Plasmaproteinen hat (Borvak J E., 1998).

Jedes Blutgefäß ist mit Endothelzellen ausgekleidet, deren primäre Aufgabe neben der Blutgerinnung im Stoffaustausch zwischen Blut und dem Gewebe besteht. Dabei wird auch IgG über ein Endosom dem lysosomatischen Abbauweg zugeführt und erfährt dabei den Abbau durch saure Hydrolyse (Ward E S., 2003).

Ein möglicher Weg des Recyclings von IgG wurde wie folgt postuliert:

Anstatt nach dem Einschluss in ein Endosom durch Verschmelzung dessen mit einem Lysosom und einem damit verbundenen pH Drift ins Saure durch Hydrolasen abgebaut zu werden, findet abhängig von diesem Abfall des pH Wertes eine Bindung zum auf der Endothelwand verankerten FcRn Rezeptor statt, wodurch ein Mechanismus in Gang gesetzt werden soll, durch den der weitere Abbauweg des Endosoms blockiert wird und eine Öffnung des Endosoms zum Blutkreislauf hin stattfindet.

Der im Blut herrschende physiologische pH Wert initiiert das Lösen der Bindung zwischen FcRn und IgG, woraufhin IgG in den Blutkreislauf zurückgeführt wird (Israel E. J. 1996).

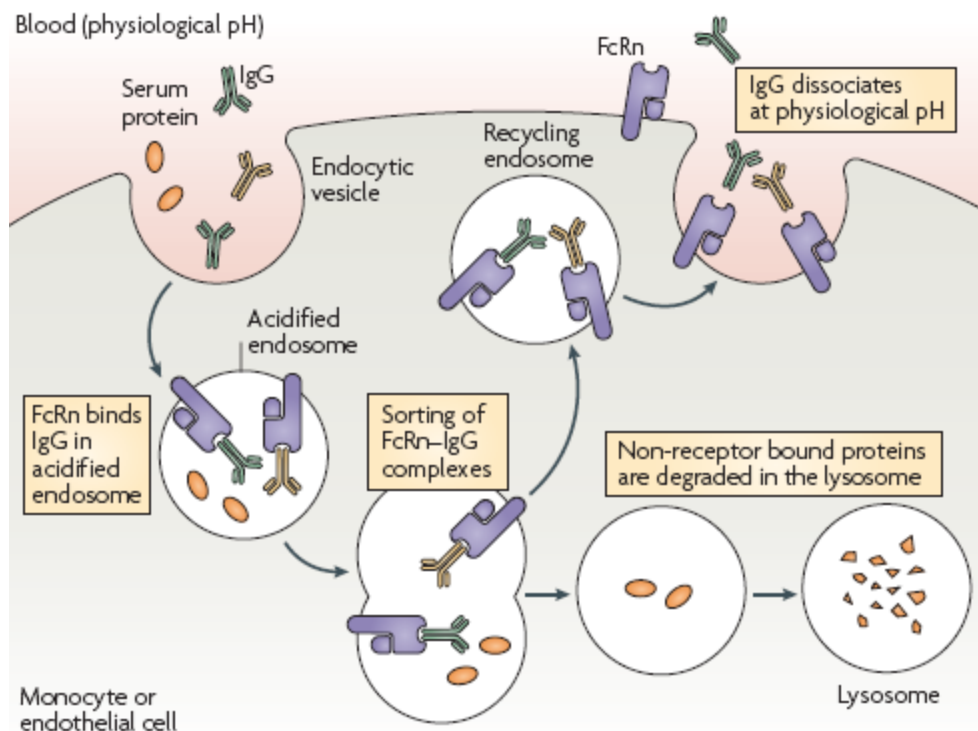


Abb. 1.4:

Schematische Zeichnung des postulierten Recyclingmechanismus von IgG durch FcRn

(Roopenian D. C. 2007 )

### 1.3 Die Bindung zwischen Albumin und dem neonatalen Fc-Rezeptor

Die Bindung zwischen Albumin und dem FcRn wurde zufällig gemacht. Im Jahr 2003, über 10 Jahre nach der Isolierung des FcRn und dem Nachweis der Bindung zu IgG, wurde der FcRn in CHO Zellen exprimiert. Das dabei verwendete Zellkulturmedium enthielt fötales Kälberserum, was zu einem großen Teil aus Rinderalbumin besteht. Die Aufreinigung des FcRn erfolgte durch Ausnutzung der Bindung zu IgG anhand einer Affinitätschromatografie an einer IgG Matrix. Die Elution erfolgte durch eine Änderung des pH Wertes von 5,8 zu 8,1. Bei einer anschließenden qualitativen Analytik der Reinheit des Eluats durch SDS-PAGE trat neben der Bande bei 35 kDa des FcRn Rezeptors und der 12 kDa Bande des  $\beta$ -2 Mikroglobulins eine weitere bei 67 kDa auf,

die als Albumin identifiziert wurde. In einem Kontrollexperiment wurde unbenutztes Zellkulturmedium dem gleichen Aufreinigungsschritt unterzogen, wobei keine Bande im SDS-PAGE auftrat; somit war eine pH Wert abhängige Bindung zwischen dem FcRn und Albumin postuliert.

In weiteren Versuchen wurden FcRn und Albumin in Abwesenheit von IgG bei verschiedenen pH Werten inkubiert und durch SDS-PAGE untersucht. Die pH Wert abhängige Bindung zwischen FcRn und Albumin wurde damit qualitativ nachgewiesen; darüber hinaus noch die Möglichkeit der Bildung eines Komplexes aus den drei Proteinen Albumin, IgG und FcRn (Chaudhury C 2003).

Weitere Untersuchungen dieser Bindung wurden durch SPR und isothermale Titrationskalorimetrie durchgeführt. Dabei wurde die Bindung zwischen IgG und FcRn bei verschiedenen pH Werten untersucht; weiter wurde die Bindung von einzelnen der drei Albumindomänen zu FcRn untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die dritte Albumindomäne um ein vielfaches stärker bindet als die erste und zweite zusammen, wodurch die Bindestelle von Albumin zum FcRn auf dessen dritte Domäne einzugrenzen ist. Weiter wurde durch ITC eine eins zu eins Bindungsstöchiometrie der beiden Moleküle belegt. Im Gegensatz zu IgG, das stärker an FcRn Dimere bindet als an das Monomer, bindet Albumin wohl ausschließlich an das FcRn Monomer. Die durch SPR bestimmten Gleichgewichtskonstanten der Dissoziation liegen bei pH Werten von 5,0-6,0 unter einem  $[\mu\text{M}]$ ; es findet also keine Dissoziation statt, bei pH 7 dagegen liegt diese über 400  $[\mu\text{M}]$ , es findet also eine sehr starke Dissoziation und damit nahezu keine Bindung statt. Die Dissoziationskonstante verhält sich über den pH Bereich von fünf bis sieben reziprok zur Assoziationskonstante. Dadurch ist bewiesen, dass die Bindung stark vom pH Wert abhängig ist und schon der Wechsel um eine halbe pH Stufe über eine Bindung entscheidet (Chaudhury C. 2006). Diese stark vom pH abhängige Bindung gibt Anlass zur Vermutung, dass der FcRn Albumin analog zu einem für die Bindung zu IgG bereits bewiesenen Mechanismus bindet (vgl. Kap.: 1.2.3). Für eine Histidin vermittelte Bindung zwischen FcRn und IgG kommt insbesondere das sterisch begünstigte Histidin an Stelle 166 in Frage. Bewiesen wurde der Starke Einfluss des Histidins an Stelle 166 des FcRn Rezeptors durch die Herstellung eines rekombinanten FcRn mit einem Alanin an Stelle, des Histins. Mit dieser FcRn Mutante wurden Bindungsversuche zu Albumin im SPR durchgeführt und keine Bindung zu Albumin festgestellt. Der negative Ausgang des Bindungstests konnte durch einen *ELISA* bestätigt werden. Zahlreiche andere Aminosäuren konnten als für die Bindung relevant ausgeschlossen werden (Andersen J T., 2006).

### 1.3.1 Der Einfluss des FcRn auf die Halbwertszeit von Albumin

Nachdem eine Bindung von FcRn zu Albumin nachgewiesen wurde, die sehr wahrscheinlich dem Typ der Bindung von FcRn zu IgG stark ähnelt, wurden Parallelen in den Eigenschaften beider Plasmaproteine in der Literatur gesucht und gegenübergestellt (Chaudhury C 2003). Dabei fiel auf, dass IgG und Albumin zahlreiche Gemeinsamkeiten haben, die mit deren Bindung zum FcRn in Verbindung gebracht werden können oder dadurch bedingt sind.

Die Abbaurate beider Proteine ist abhängig von deren Konzentration im Serum; diese Eigenschaft haben andere Plasmaproteine, wie z. B. Fibrinogen, IgA und IgM nicht (Freeman T. 1965), (Waldmann T A., 1969), (Schultze H. E. 1966).

Beide Proteine haben eine außerordentlich lange Halbwertszeit von ca. 3 Wochen, andere Plasmaproteine dagegen haben eine Halbwertszeit von unter einer Woche, viele nur einen Tag oder gar nur Stunden (MacKay M E., 1957), (Strober 1990), (Peters T J., 1996).

Die Annahme für einen Recyclingmechanismus über einen einzigen oder zwei verschiedene Rezeptoren wurde bereits in den 1960er Jahren postuliert, jedoch lange nicht weiter verfolgt (Schultze H E., 1966), (Brambell F W R., 1970). Erst die Entdeckung der Bindung von Albumin zum FcRn gab den Anlass zu einer Untersuchung im mittlerweile vorhandenen Tiermodell. Dazu wurden FcRn *knock-out* Mäusen humanes Serumalbumin appliziert und eine Abbaukinetik erstellt. Dabei wurde anhand von Daten aus der zweiten Abbauphase zwischen 24 und 120 Stunden eine Halbwertszeit für humanes Serumalbumin von 25 Stunden in der FcRn *knock-out* Maus bestimmt. Im Kontrolltier, einer Wildtyp Maus, dagegen betrug die Halbwertszeit von Serumalbumin 35 Stunden; die Abbaukinetik wurde ebenfalls anhand von Proben zu Entnahmezeitpunkten zwischen 24 und 120 Stunden erstellt. Zum Vergleich, der Unterschied in der Halbwertszeit von IgG in einer FcRn *knock-out* Maus beträgt nach der gleichen Methode gemessen 19 Stunden gegenüber 95 Stunden in der Wildtyp Maus. Daraus wurde die These erstellt: FcRn verlängert die Halbwertszeit von Albumin um ein Drittel (Chaudhury C 2003). Die von Chaudhury gezeigte Bindung von FcRn zu Albumin durch SPR und ITC ist unstrittig und eindeutig vorhanden. Die Tierversuche in der FcRn *knock-out* Maus, wie in der Wildtyp Maus dagegen bedürfen einer kritischen Betrachtung aus folgenden Gründen. Der Autor nennt es eine Pilotstudie, die mit nur drei Mäusen durchgeführt worden ist; vermutlich sind auf Grund der wenigen Tiere über die ersten 24 Stunden keine Proben genommen worden. Die erste Phase des Abbaus erfolgt logarithmisch und bedarf zur Erstellung einer zuverlässigen Kinetik

einer größeren Dichte der Entnahmezeitpunkte; gerade diese Phase ist für eine Aussage über die Halbwertszeit eines applizierten Proteins essentiell; eine für die Kinetik wichtige Wiederfindungsrate wurde ebenfalls nicht bestimmt.

Die These, der FcRn verlängere die Halbwertszeit von Albumin um ein Drittel, bedarf einer Überprüfung durch eine Kinetik über den gesamten Zeitraum, von der Applikation des Albumins in die *knock-out* Maus bis zur Nachweisgrenze des verwendeten Tests, woraus eine vollständige Kinetik erstellt und ausgewertet werden sollte.

Weitere Belege für einen Zusammenhang zwischen der Bindung von FcRn zu Albumin waren zum Zeitpunkt der Aufnahme der Arbeit nicht existent.

## 1.4 Ziel der Arbeit

Das Ziel der Arbeit besteht in der Aufklärung der Aminosäuren im Albumin, die für die Bindung zum FcRn relevant sind. Darauf aufbauend besteht das zusätzliche Ziel darin, diese Aminosäure oder Aminosäuresequenz durch eine andere zu ersetzen, um die Bindung zum FcRn zu verstärken und dadurch ein Albumin mit einer verlängerten Halbwertszeit zu erhalten.

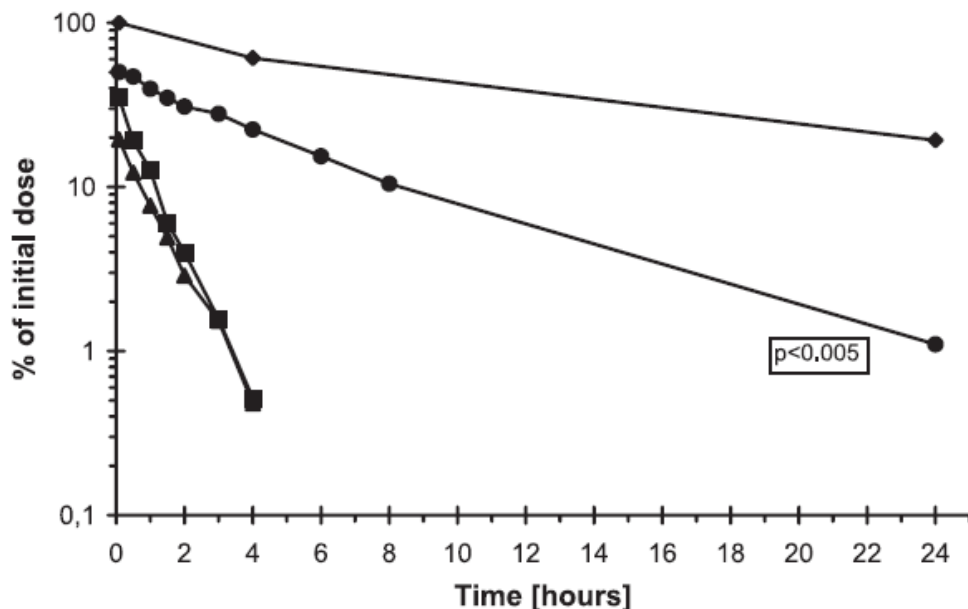
### 1.4.1 Motivation für die Entwicklung eines halbwertszeitverlängerten Albumins

Albumin bietet auf Grund seiner sehr langen Halbwertszeit von 19 Tagen die Möglichkeit, als Fusionsprotein für Proteine mit kurzer Halbwertszeit eingesetzt zu werden, um die Halbwertszeit dieser zu verlängern. Besonders groß ist der Effekt der Halbwertszeitverlängerung durch eine Fusion mit Albumin bei therapeutischen rekombinanten Proteinen, die selbst eine sehr kurze Halbwertszeit haben. Der Nutzen einer Halbwertszeitverlängerung für ein therapeutisches Protein ist um so größer, je höher die applizierte Dosis ist; in besonderen Fällen wird eine subkutane Applikationsform anstatt einer intravenösen erst möglich. So konnte z.B. für das rekombinant hergestellte Protein Interferon- $\alpha$  eine Halbwertszeitverlängerung durch Albuminfusion bei subkutaner Applikation im Javaneraffen um den Faktor 18 erreicht werden (Osborn B.L. 2002).

Eine Halbwertszeitverlängerung durch Albumin ist auch bei komplexeren rekombinant hergestellten Proteinen, wie z.B. Blutgerinnungsfaktoren möglich, ohne deren



enzymatische Aktivität über Maßen herabzusetzen. So ist es bereits gelungen, die Halbwertszeit eines rekombinanten Blutgerinnungsfaktors VII, der im Menschen nur eine Halbwertszeit von 2,5 Stunden hat, durch Albuminfusion zu verlängern.



**Abb. 1.5:**

**Abbau von rHA-wt (Rauten), rFVIIa-FP (Kreise), Novoseven® (Quadrate) und rFVIIa (Dreiecke), in der Ratte logarithmiert dargestellt über die Zeit, in Prozent der applizierten Dosis. (Weimer T. 2008)**

Im Tiermodell zeigte die Fusion aus rFVIIa und Albumin eine sechsfache Halbwertszeitverlängerung gegenüber dem rekombinant hergestellten Wildtyp rFVIIa. Die molare Aktivität des rFVIIa-FP betrug anstatt 104 IU/nM nur noch 72 IU/nM, was aber durch die stark erhöhte Halbwertszeit mehr als ausgeglichen wird und insgesamt zu einer deutlich höheren Bioverfügbarkeit des rFVIIa-FP gegenüber dem rFVIIa-Wildtyp führt (Weimer T. 2008).

Für therapeutische Proteine, die in vivo durch Abspaltung eines Peptids erst aktiviert werden, bietet sich die Möglichkeit, Albumin über einen spaltbaren Linker zu fusionieren, der die gleiche Aminosäuresequenz wie die Aktivierungssequenz des inaktiven Proteins hat. Das führt zu einer verlängerten Halbwertszeit des inaktiven Proteins, bei der Aktivierung wird das Albumin gleichzeitig mit dem Aktivierungspeptid abgespalten, so dass das aktivierte therapeutische Protein in der gleichen Form wie der Wildtyp vorliegt, ohne dass dessen Aktivität maßgeblich durch ein daran fusioniertes Albumin negativ beeinflusst wird.

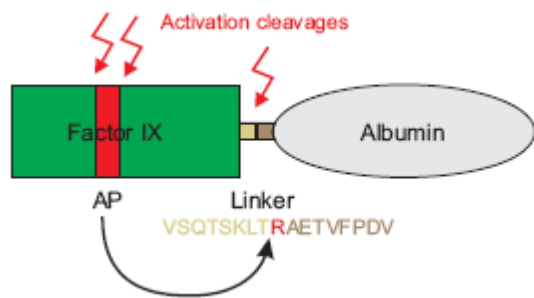


Abb. 1.6:

Schematische Zeichnung eines rFIX als Fusionsprotein zu Albumin durch spaltbaren Linker und dessen Spaltstellen zur Aktivierung. (Schulte S. 2009)

So ist es gelungen, einen halbwertszeitverlängerten rFIX durch Albuminfusion herzustellen, dessen Halbwertszeit in der Ratte 2,8 mal länger ist als die des rFIX Produktes Benefix® und dabei die molare spezifische Aktivität durch den spaltbaren Linker in einem tolerablen Rahmen herabgesetzt wurde. Dadurch hat das Fusionsprotein eine größere Bioverfügbarkeit als das Produkt Benefix® (Metzner H J. 2009).

Die Technik der Halbwertszeitverlängerung durch Albumin bietet auch in Zukunft viel Potential zur Verbesserung zahlreicher therapeutischer, rekombinanter Proteine. Eine weitere Steigerung der Effizienz dieser Technik könnte der Einsatz eines Albumins mit einer verlängerten Halbwertszeit sein, um damit die Halbwertszeit eines rekombinanten Proteins noch weiter zu verlängern, als das bisher mit dem Wildtyp-Albumin möglich ist.

#### 1.4.2 Die Identifikation der Bindestelle zwischen FcRn und Albumin

In einem ersten Schritt wurde versucht, durch Bioinformatik-Analysen, durchgeführt von Dr. Hofmann (*Fa. Miltenyi Biotec GmbH*), potentielle Bindestellen in der dritten Albumindomäne auf einige Aminosäuresequenzen einzugrenzen. Daraufhin wurden entsprechende Albuminmutanten hergestellt und deren Bindung zum FcRn evaluiert; auf Basis der daraus gewonnenen Erkenntnisse wurden weitere Bioinformatik-Analysen durchgeführt, die die Grundlage für einzelne Punktmutationen im Albumin darstellten, um dessen Bindestelle auf einzelne Aminosäuren einzugrenzen und gegebenenfalls zu verstärken.

## 1.5 Vorgehen

Die Entwicklung eines halbwertszeitverlängerten Albumins soll über ein gesteigertes Recycling durch den FcRn erreicht werden, indem die für die Bindung verantwortliche Aminosäuresequenz im Albumin dahingehend verändert werden soll, dass diese eine verstärkte Bindung zum FcRn bewirkt und das Albumin dadurch in höheren Raten zurückgewonnen werden kann.

Das setzt allerdings voraus, dass die Bindung von Albumin zum FcRn für den Abbau oder das Recycling von Albumin tatsächlich relevant ist und ein solcher postulierter Recyclingmechanismus überhaupt existiert.

Sollte dies der Fall sein, muß die postulierte Bindestelle in der dritten Domäne des Albumins zunächst gefunden werden und diese durch ein Tiermodell mit einem Recyclingmechanismus in Verbindung gebracht werden. In einem weiteren Schritt muss diese gefundene Bindestelle durch eine Aminosäure oder Aminosäuresequenz substituiert werden, so dass die Bindung nur bei leicht saurem pH von 5-6,5 verstärkt wird, nicht jedoch bei phys. pH, da gemäß dem postulierten Recyclingmechanismus Albumin nur im angesäuerten Endosom an den FcRn binden soll. (vgl. Kap. 1.2.4) Würde man durch die Substitution von Aminosäuren an der Bindestelle eine Bindung bei phys. pH induzieren, könnte sich das bereits im Endosom an den FcRn gebundene Albumin nach dem Recycling im Blut nicht mehr vom FcRn lösen und würde abgebaut.

Da die Verstärkung der Bindung von Albumin zum FcRn durch Substitution von Aminosäuresequenzen auf die Identifikation der für die Bindung verantwortlichen Sequenzen aufbaut, wurde das Projekt in zwei chronologisch aufeinanderfolgenden Schritten durchgeführt.

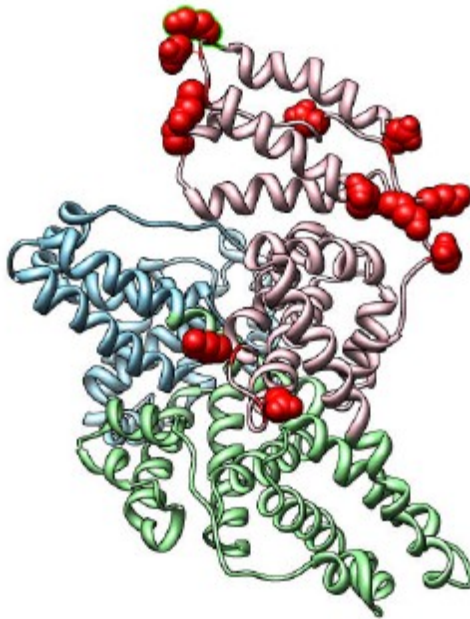
### **1.5.1.1 Bioinformatische Analysen zur Eingrenzung potentieller Bindestellen von Albumin zu FcRn (Hofmann K., 2007)**

Zur Vorhersage potentieller FcRn Bindestellen in der dritten Domäne des Albumins zum FcRn wurde sowohl ein evolutionär basierter Ansatz gewählt, der auf Grund des bereits existenten hochaufgelösten Röntgenstrukturbildes von Albumin durch eine strukturbasierte Analyse ergänzt werden konnte.

Als erster Ansatz wurde die Aminosäuresequenz der dritten Albumindomäne zahlreicher Spezies tabellarisch angeordnet und im Hinblick auf deren Konservierung über die verschiedenen Spezies miteinander verglichen. Aus diesen Tabellen ist zu

erkennen, dass die Aminosäuren die sich in  $\alpha$ -helikalen Strukturen befinden, besonders stark konserviert sind und demnach potentielle Bindestellen darstellen könnten. (vgl. Anhang 7.2)

Als zweite Methode wurden stark konservierte potentielle Bindestellen auf ihre räumliche Lage an Hand von Röntgenstrukturdaten untersucht.



**Abb. 1.7:**

**Röntgenstrukturbild von Albumin, konservierte und exponierte AS sind durch rote Kalotten hervorgehoben und stellen potentielle Bindestellen zum FcRn dar (Hofmann K., 2007).**

In einer weiteren Methode wurde ausgehend von der Annahme, dass ein strukturiertes FcRn-Peptid ein unstrukturiertes Albumin-Peptid erkennt, eine Prognose erstellt. Dieser Ansatz wurde auf Grund von Erfahrungen mit Rezeptoren der MHC-Klasse gewählt und entspricht der zuvor publizierten Aussage, dass die dritte Albumindomäne gerichtet den FcRn bindet (Chaudhury C 2003).

Ausgehend von diesen Annahmen wurden sechs sich nicht überlappende Oberflächenbereiche definiert, die für eine Bindung an den FcRn in Frage kommen könnten. (vgl. Abb. 1.8.)

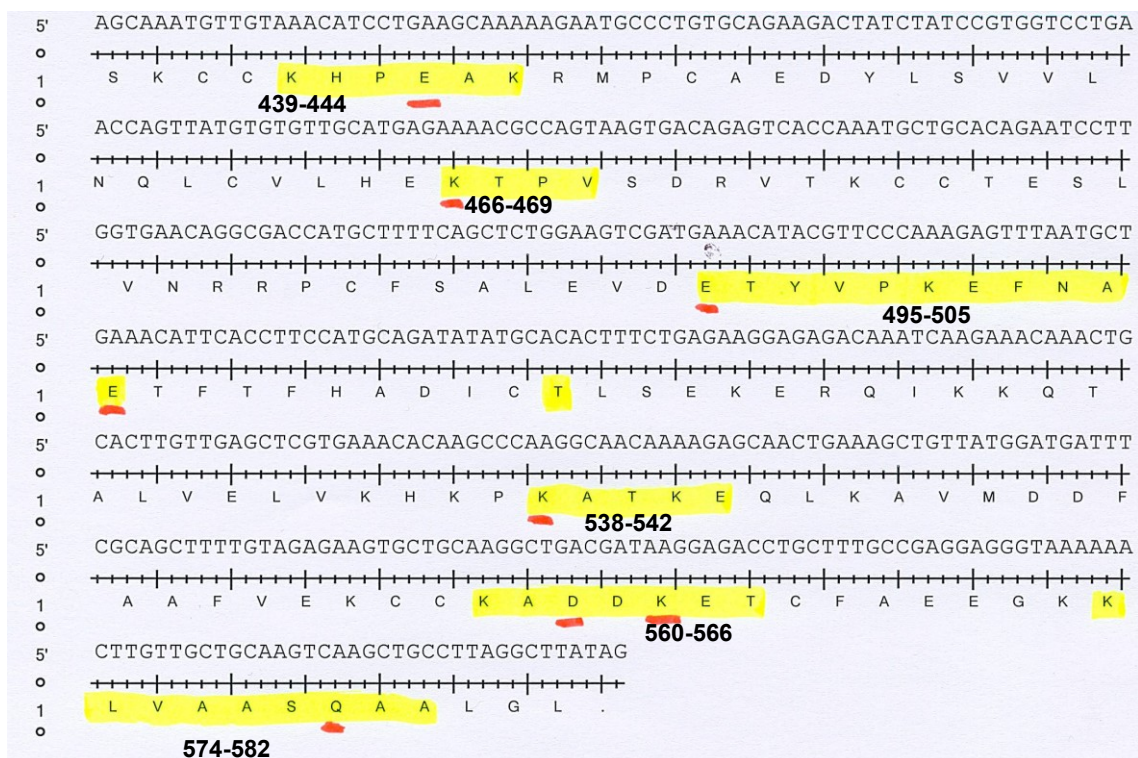


Abb. 1.8:

Übersicht über die potentiell für eine Bindung zum FcRn in Frage kommenden Aminosäuren in der dritten Albumindomäne (gelb unterlegt) und besonders potentiell für eine Bindung relevante Aminosäuren (rot unterlegt), genannte Positionen von Aminosäuren wurden vom ersten Methionin an gezählt

Für jeden dieser Bereiche wurden auch einzelne Aminosäuren genannt, die die höchste Bindungswahrscheinlichkeit haben. Es handelt sich bei diesen Bereichen um folgende einzelne Aminosäuren: Im Bereich KADDKET das Asp-562 und das Lys-564, im Bereich KHPEAK das Glu-442, im Bereich ETYVPKEFNAE die beiden Glutaminsäuren an Stelle 495 und 505, sowie im Bereich KATKE das Lysin an Stelle 538.

#### **1.5.1.2 Experimentelles Vorgehen zur Eingrenzung potentieller Bindestellen auf eine Aminosäure oder Aminosäuresequenz**

Von jeder der sechs Aminosäuresequenzen, die aus Sicht der Bioinformatik für eine Bindung zum FcRn in Frage kommen, wurde eine Albuminvariante kloniert, exprimiert und aufgereinigt, die an Stelle dieser in Frage kommenden Aminosäuresequenzen Alanine enthielt. Sollte eine dieser sechs an verschiedenen Stellen alaninisierten Albuminvarianten keine oder eine verringerte Bindung zum FcRn zeigen, ist die Bindestelle zum FcRn unter den alaninisierten Aminosäuren zu suchen, wodurch die Suche auf eine von sechs verschiedenen Abfolgen eingeschränkt worden wäre.

Weiter wurde der humane FcRn aus einer cDNA Bank isoliert, um mittels SPR Bindungsversuche zu den verschiedenen alaninisierten Albuminen durchzuführen. Das SPR wurde hier auf Grund der Möglichkeit einer Charakterisierung der Bindung kombiniert mit einer möglichst kleinen Probenmenge gewählt. Als weiteres Testsystem wurden die alaninisierten Albumine Ratten appliziert, um eine Abbaukinetik zu erstellen. Dieses Modell wurde gewählt, weil es als *in vivo* Modell sehr realitätsnah ist und eine zuverlässige Methode zum Vergleich von Halbwertszeiten darstellt. Beide angewandten Methoden bieten kombiniert die Möglichkeit, die Bindung des Proteins mit seiner Halbwertszeit zu verknüpfen.

#### **1.5.1.3 Mögliche Ergebnisse aus den analytischen Experimenten und deren Interpretation**

Durch die Kombination der Methoden SPR und Tiermodell können für ein an einer bestimmten Stelle alanisiertes Albumin folgende Aussage getroffen werden:

1. Bände dieses alanisierte Albumin nicht oder deutlich schwächer an den FcRn im SPR und zeige eine deutlich verminderte Halbwertszeit in der Ratte, wäre dies ein starkes Indiz dafür, dass die Bindestelle von Albumin zum FcRn innerhalb der alaninisierten Aminosäuresequenz läge und diese Bindung einen Einfluss auf dessen Abbau hätte. Alternativ könnte das Albumin durch die Alanisierung auch so stark verändert sein, dass es nicht mehr an den FcRn bände und auf Grund seiner veränderten Faltung schneller in der Ratte abgebaut werden würde.

2. Bände eines der alaninisierten Albumine genauso wie die Kontrolle Wildtyp Albumin im SPR an den FcRn und würde auch genauso langsam in der Ratte abgebaut werden, wäre dies ein starkes Indiz dafür, dass die alanisierte Aminosäuresequenz weder für den Abbau noch für die Bindung an den FcRn eine signifikante Rolle spielte.
3. Bände eine Albuminvariante vergleichbar stark wie der Wildtyp an den FcRn im SPR, würde aber schneller als Wildtyp-Albumin abgebaut werden, so hätte die alanisierte Aminosäuresequenz keinen Einfluss auf die Bindung zum FcRn, wohl aber auf die Stabilität des Albumins und auf dessen Abbau durch einen anderen Abbaumechanismus.
4. Bände eine Albuminvariante im SPR nicht oder deutlich schwächer an den FcRn, würde aber genauso langsam in der Ratte abgebaut wie das Wildtyp Albumin, so enthielte die alanisierte Aminosäuresequenz für die Bindung FcRn relevante Aminosäuren, nicht aber für dessen Abbau.

In den beiden letzteren Fällen muss ein Zusammenhang zwischen der Bindung von Albumin zum FcRn und der Halbwertszeit von Albumin und einem damit verbundenen postulierten Recyclingmechanismus hinterfragt werden. Für den ersten und dritten Fall muss eine weitere Prüfung des Albumins auf dessen korrekte Faltung hin erfolgen.

### **1.5.2 Punktmutationen einzelner Aminosäuren**

Anlass zur Mutagenese einzelner Aminosäuren, einer potentiellen Bindestelle am Albumin zum FcRn, war dann gegeben, wenn bei den Untersuchungen von Albuminen mit alaninisierten Sequenzen eine Albuminvariante durch eine deutlich verkürzte Halbwertszeit in der Ratte und zusätzlich durch eine schwächere Bindung zum FcRn durch SPR aufgefallen war.

Bioinformatische Analysen wurden für den Bereich der zuvor alaninisierten Sequenz erstellt; dabei wurden weitere einzelne Aminosäuren in diesem Bereich postuliert, die einen starken Einfluss auf die Bindung zum FcRn haben könnten. Dabei wurden Aminosäuren zur Substitution dieser zu einer potentiellen Verstärkung wie auch Alanine zur Abschwächung der Bindung vorgeschlagen. Die Substitution einzelner Aminosäuren diente zum einen dem Zweck, die potentielle Bindestelle zum FcRn auf einzelne Aminosäuren einzuschränken, zum anderen Indizien über den postulierten Abbaumechanismus zu gewinnen.

### **1.5.2.1 Bioinformatische Analysen zur Substitution einzelner Aminosäuren (Hofmann K., 2009)**

Eine bioinformatische Analyse zur Vorhersage der für eine verstärkte Bindung an den FcRn notwendigen Aminosäuren zur Substitution ist nicht möglich. Um die einzige Möglichkeit, die über eine Zufallsmutagenese hinausgeht, zu nutzen, wurden wie auch schon in der früheren bioinformatischen Untersuchung (vgl. 1.5.1.1) die Aminosäuresequenzen zahlreicher Spezies miteinander verglichen und deren Konservierungsgrad ausgewertet. Im Vordergrund stand es, einzelne Aminosäuren zu finden, die gut genug konserviert waren, um als Bindestelle zum FcRn in Frage zu kommen und nicht zu gut, um durch eine Mutagenese einen zu große negativen Einfluss auf die Faltung des Proteins zu nehmen; weiter wurden Aminosäuresequenzen, die zwischen Mensch und anderen Säugern abweichen, bevorzugt fokussiert.

Unter diesen Voraussetzungen wurden einige Punktmutationen in Aminosäuresequenzen vorgeschlagen, die nach einer Alaninisierung vom Wildtyp-Albumin abweichende Ergebnisse entweder bei SPR Messungen oder in einer Abbaukinetik in der Rattekinetik zeigten. Dabei wurden einzelne Aminosäuren mittels Mutagenese durch Glutaminsäure, Arginin, Histidin, Lysin, Glycin, Glutamin oder Asparaginsäure substituiert. Von diesen Vorschlägen abweichend wurden zunächst die für eine Bindung in Frage kommenden Aminosäuren durch Alanine ersetzt, um eine Bindung weiter einzuschränken und um eine qualitative Aussage über das Bindungspotential der einzelnen Aminosäure machen zu können. Die vorgeschlagenen Punktmutationen wurden gleichzeitig durchgeführt, um möglichst schnell eine Aussage zu erhalten.

### **1.5.3 Experimentelle Umsetzung und mögliche Ergebnisse der Substitution einzelner Aminosäuren.**

Die von der Bioinformatik vorgeschlagenen Punktmutationen sollten im Albumin-Wildtyp durch Mutagenese eingebracht werden und die Albuminvarianten sollten analog zu den zuvor beschriebenen (vgl. Kap. 1.5.1.1) Mutanten exprimiert und aufgereinigt werden.

Diese sollten ebenfalls analog zu diesen sowohl durch eine Abbaukinetik in der Ratte wie auch durch SPR-Untersuchungen charakterisiert werden.



Für die Albumine, bei denen einzelne Aminosäuren durch Alanine ersetzt wurden, können die gleichen Aussagen getroffen werden wie die, die bereits für die zuvor mehrfach alaninisierten Albumine formuliert wurden. (vgl. Kap.: 1.5.1.3)

Für Punktmutanten, bei denen andere Aminosäuren als Alanine substituiert wurden, sind zusätzliche, andere Folgerungen aus den Abbaukinetiken und den Bindungsbestimmungen durch SPR abzuleiten:

5. Eine stärkere Bindung des punktmutierten Albumins an den FcRn Rezeptor im SPR und ein schnellerer Abbau in der Ratte als Wildtyp-Albumin indizieren einen Zusammenhang zwischen der Bindung von Albumin an FcRn und dessen Abbau.
6. Die gleiche Folgerung würde man auch ziehen, wenn die Halbwertszeit der Punktmutante in der Ratte, bei einer zugleich schwächeren Bindung an den FcRn länger wäre als die des Wildtyp-Albumins. In diesem Fall wäre durch die Punktmutation ein FcRn vermittelter Abbaumechanismus ausgesetzt worden.
7. Eine stärkere Bindung des punktmutierten Albumins an den FcRn Rezeptor im SPR und eine verlängerte Halbwertszeit in der Ratte im Vergleich zu Wildtyp-Albumin wären ein starkes Indiz für die Existenz, eines FcRn vermittelten Recyclingmechanismus von Albumin.

Die Aussagen Nummer fünf und sechs schließen für die Aminosäure an der mutierten Stelle nicht die potentielle Funktion eines FcRn vermittelten Recyclingmechanismus aus. Das Bindungsverhalten bei diversen pH-Werten sowie die Substitution anderer Aminosäuren an dieser Stelle wären aussagekräftige Folgeexperimente zur Funktion der Bindung beider Proteine.

## 2 Material und Methoden

Sämtliche verwendeten Chemikalien, Lösungen und Geräte sind der Übersicht halber im Anhang Kap 7.1 aufgelistet.

### 2.1 Gentechnische Methoden

#### 2.1.1 Die Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion ist eine Methode zur exponentiellen Vervielfältigung von DNA *in vitro*. Das Prinzip der PCR basiert auf der Funktion einer thermisch stabilen Polymerase, die bei Temperaturen von 68°C bis 72°C Desoxynukleotide zu einem zum *Template* codogenen DNA-Strang synthetisiert. Sie kann dies nicht *de novo*, sondern benötigt dazu eine DNA Startsequenz, einen *primer*.

Der Ablauf einer PCR erfolgt temperaturgesteuert in drei sich wiederholenden Schritten:

1.

Einer Denaturierung bei 95°C; hierbei werden die Wasserstoffbrückenbindungen in der Doppelhelix der DNA aufgebrochen, so dass die DNA einzelsträngig vorliegt.

2.

Einer Primerhybridisierung bei 55-65°C, abhängig von Zusammensetzung und Länge der Sequenz des *Primers*, hierbei hybridisieren die *Primer* an das einzelsträngige DNA *Template*.

3.

Einer Elongationsphase bei 72°C; hierbei verlängert die Polymerase den zuvor hybridisierten *Primer* codogen zum einsträngig vorliegenden DNA *template*.

Durch die Wiederholung dieser drei Schritte findet ab dem zweiten Schritt eine exponentielle Vermehrung des DNA-*Templates* statt. Dieses Grundprinzip der Vermehrung von DNA *in vitro* gilt als eine der wichtigsten Schlüsseltechnologien in der Biochemie und ist seit ihrer Erfindung (Saiki RK. 1985) ständig weiter entwickelt.

Von der Polymerasekettenreaktion existieren mittlerweile diverse Unterformen, in denen das Grundprinzip auf zahlreiche Anwendungsgebiete angepasst wurde. In der vorliegenden Arbeit wurden die folgenden verwendet.

#### **2.1.1.1 Die „nested“ Polymerasekettenreaktion**

Die nested PCR findet Anwendung bei besonders kleinen Mengen von Template-DNA und der Gegenwart von großen Mengen anderer DNA mit ähnlicher Sequenz, z. B. bei der Synthese einer cDNA. Um ein Gen oder einen Genabschnitt in der gewünschten Reinheit mit möglichst wenig fremdem Amplifikat, welches auf unspezifische Bindungen der *primer* zum *template* zurückzuführen ist, zu erhalten, werden zwei PCRs in Folge mit unterschiedlichen *primern* durchgeführt. Dabei entspricht die zweite PCR der Amplifikation des gewünschten Genabschnitts oder Gens, der in einer ersten PCR eine Amplifikation des *templates* vorausgeht. Dazu werden die *primer* der ersten PCR *upstream* von denen der zweiten PCR gewählt, so dass der zu amplifizierende DNA Abschnitt als *template* für die zweite PCR bereits exponentiell vermehrt wurde und im Verhältnis zu anderer vorliegender DNA der zweiten PCR mehr *templates* bietet. In Folge dessen wird diese stärker amplifiziert als andere DNAs und ist einfacher zu isolieren (Chelly J. 1989).

#### **2.1.1.1 Die „touchdown“ Polymerasekettenreaktion**

Die *Touchdown*-Polymerasekettenreaktion besteht aus zwei PCR Reaktionen in Folge. Dabei entspricht die zweite PCR der Amplifikation des gewünschten Genabschnitts oder Gens, der in einer ersten PCR eine Amplifikation des *Templates* vorausgeht, ähnlich wie bei der *nested* PCR. Jedoch wird das *template* nicht durch ein zweites *Primerpaar* amplifiziert, sondern durch die Wahl der *Annealing*-Temperatur der *primer*. Bei der touchdown PCR geht der zweiten Phase der PCR, die mit der optimalen Annealingtemperatur für die *primer* durchgeführt wird, eine erste Phase voraus, bei der die Annealingtemperatur einige Grad über der optimalen liegt und nach jedem Amplifikationszyklus herabgesetzt wird, bis es die optimale Annealingtemperatur

erreicht hat. Dies hat zur Folge, dass bei den „heißeren“ Annealingtemperaturen der ersten Phase DNA amplifiziert wird, an die der *primer* spezifischer bindet, wodurch der zu amplifizierende DNA Abschnitt als *template* für die zweite Phase der PCR vermehrt vorliegt. In Folge dessen wird diese stärker amplifiziert als andere DNAs und ist einfacher zu isolieren (Don RH. 1991).

Die *touchdown* PCR ist mit einer nested PCR auch kombinierbar, um ein Höchstmaß an Spezifität für eine DNA Amplifikation zu erhalten; die Methoden wurden zur Isolierung von Genen aus einer cDNA Bank eingesetzt (vgl. 3.1.3.1).

#### 2.1.1.2 Die Mutagenese PCR

Die zielgerichtete Mutagenese-PCR erlaubt das Löschen, Einfügen oder Ersetzen von DNA-Basen in einem Plasmid. Durch die Auswahl eines zueinander komplementären *Primerpaares*, welches in einer oder bis zu einhundert Basen von der *Templatesequenz* abweicht, kann aus einem Plasmid durch eine PCR mit diesem *Primer* diese im Primer abweichende Sequenz in die Plasmid DNA eingebracht werden. Der Polymerase der Mutagenese PCR dient dabei ein geschlossenes Plasmid als *template* vor das in jedem PCR Zyklus linear vermehrt wird. Dem liegt die Tatsache zu Grunde, dass nach jedem PCR-Zyklus das mutagenisierte Plasmid einen *nick* enthält, welches nur durch das Enzym Ligase geschlossen werden kann. Desweiteren unterscheidet sich die *in vitro* hergestellte DNA von einer *in vivo* vorkommenden durch die fehlende Methylierung. Diesen Unterschied kann man sich im Anschluss an eine Mutagenese zu nutzen machen, indem man die in der Mutagenese-PCR eingesetzte *template* DNA durch das Enzym *DpnI* spezifisch abbaut. (Weiner MP. 1994)

#### 2.1.2 Restriktionsenzyme

Restriktionsenzyme sind Endonukleasen, die als Bestandteil der prokaryontischen Phagenabwehr an ihrer jeweiligen Erkennungssequenz spezifisch einen DNA-Strang durchtrennen. Die Erkennungssequenz eines Restriktionsenzym besteht aus einer Basenabfolge von vier bis zehn Nukleotiden, die zu Ihrem gegenläufigen Strang ein Palindrom bilden. Bei der Restriktion eines DNA Stranges entstehen, anhängig vom verwendeten Enzym an den Schnittstellen, Enden die verschiedene Eigenschaften haben können, einen 5'-oder 3' Überhang oder glatte Enden. Solche Enden müssen zueinander gleich sein oder durch entsprechende Methoden einander (vgl. 2.1.6 und

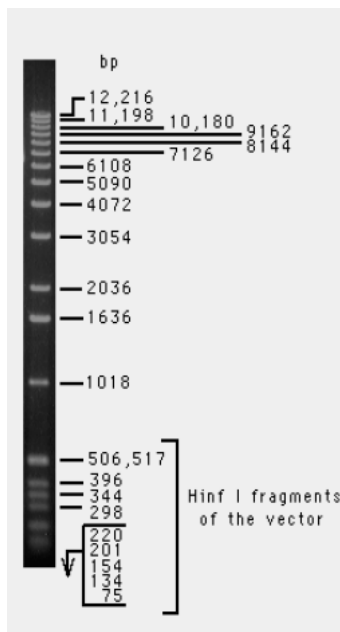
2.1.5) angeglichen werden, sonst ist eine Ligation der geschnittenen DNA-Fragmente nicht möglich (Arber W. 1962).

**Tab.: 2.1: Verwendete Restriktionsenzyme und deren Eigenschaften**

<b>Enzym</b>	<b>Erkennungs- sequenz 5'-3'</b>	<b>erzeugter Überhang</b>	<b>Inkubations- Temperatur [°C]</b>
<b>BamHI</b>	G/GATCC	5'	37
<b>EcoRI</b>	G/AATTC	5'	37
<b>EcoRV</b>	GAT/ATC	blunt	37
<b>NheI</b>	G/CTAGT	5'	37
<b>NotI</b>	GC/GGCGC	5'	37
<b>XbaI</b>	T/CTAGA	5'	37

### **2.1.3 Agarosegelelektrophorese**

Die Agarosegelelektrophorese ist eine sehr weit verbreitete und unverzichtbare Methode um DNA oder RNA nach ihrer Mobilität im elektrischen Feld aufzutrennen. DNA oder RNA wandert im elektrischen Feld zur Anode, bedingt durch die negative Ladung deren Phosphatrückrats, welche zur Länge der DNA proportional ist. Die Auflösung der Trennung von DNA Fragmenten verschiedener Größe ist abhängig von der Dichte des Agarosegels, üblich sind Agarosekonzentrationen zwischen 0,5% und 3%, um DNA Fragmente mit einer Größe von 100bp-10000bp von einander zu trennen. Nach der Trennung wird die DNA mit Ethidiumbromid eingefärbt und unter ultravioletem Licht sichtbar gemacht. Mit Hilfe eines aufgetragenen Größenmarkers, der aus DNA Fragmenten bekannter Größe besteht, können die aufgetragenen Proben bestimmt werden (Adkins S. 1996). In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich der Größenmarker von „1 Kb DNA Ladder“ verwendet.



**Abb. 2.1:**Größenmarker, „1 Kb DNA Ladder“( Cat. No.15615-16) von Invitrogen zur Bestimmung der Größe von DNA Fragmenten bei der Agarosegelelektrophorese.

#### 2.1.4 Isolierung von DNA Fragmenten aus Agarosegel und das „PCR-KIT 250“

Das „PCR Kit 250“ ist ein wertvolles Werkzeug zur Reinigung von DNA-Fragmenten aus Restriktions- und PCR-Ansätzen. Das Kit basiert auf dem Prinzip der hydrophilen Interaktionschromatographie mit Kieselgel als Liganden. Die Puffer sind dabei im Bezug auf deren hydrophile Eigenschaften abgestimmt nur DNA Fragmente mit einer Länge zwischen 40bp und 10kb mit Wasser eluieren zu können, das Kit eignet sich demnach auch zum Entfernen von einzelnen Nukleotiden. Weiter kann dieses Kit auch zur Aufreinigung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen eingesetzt werden, indem man die gewünschte Bande aus dem Agarosegel ausschneidet und in einem Guanidinhydrochlorid Puffer die DNA aus der Agarose herauslöst und die DNA durch hydrophile Interaktionschromatographie isoliert.

#### 2.1.5 Das System pCR4 Topo

Das *pCR4 Topo cloning kit* ist ein Werkzeug zur Aufnahme linearisierte DNA in ein Plasmid, um dieses mit zahlreichen Restriktionsstellen zu flankieren. Dadurch kann das linearisierte DNA Fragment nach Belieben in einen Expressions-, Klonierungs- oder Sequenzierungsvektor durch Restriktion umgesetzt werden. Häufige Anwendung findet dieses System, wenn man ein durch PCR hergestelltes Amplifikat sequenzieren

möchte. Dabei wird das Amplifikat aus der PCR durch eine Taq-Polymerase mit einem zusätzlichen Desoxyadenosin an dessen Enden versehen, so dass es durch den *Topo cloning* Vektor, bedingt durch dessen 3'-Desoxythymine Überhänge, aufgenommen werden kann. Der TA-Vektor kann dabei nicht mit sich selbst ligieren, weil beide 3'-Enden des Vektors durch eine kovalent gebundene Topoisomerase belegt sind, was die Verwendung des Vektors auf DNA Fragmente mit 5'-Überhang einschränkt (Shuman S. 1994).

#### **2.1.6 Klenow fill in blunting kit NEB**

Für die Einbringung eines linearisierten DNA Fragmentes in ein Plasmid zu weiteren Klonierungsschritten, welches keinen 5'-Überhang besitzt, findet das *Klenow blunting kit* Anwendung. Es basiert auf der Nutzung der *Klenow* Polymerase. Eine Polymerase die keine 5'→3' Exonuklease-Aktivität besitzt, so dass dieses Enzym DNA Fragmente mit einem 3'-Überhang zu einem Fragment mit glatten Enden auffüllt und für einen Vektor der mit einem Restriktionsenzym geschnitten wurde, welches glatte Enden erzeugt, ligierbar macht (Klenow H. 1970).

#### **2.1.7 Ligation von DNA**

Bei der Ligation von DNA werden zwei DNA-Fragmente mit zwei zueinander komplementären Überhängen an deren Enden miteinander verknüpft. Das setzt eine Restriktion mit dem gleichen Restriktionsenzym oder die Verwendung von Restriktionsenzymen, die ein glattes Ende erzeugen, voraus. Die Verknüpfung zweier DNA-Fragmente *in vitro* basiert zunächst auf dem Zusammentreffen derer Enden, bedingt durch die Brownsche Molekularbewegung und damit abhängig und steuerbar über die Inkubationstemperatur. Haben sich zwei DNA-Enden mit komplementären Überhängen gefunden, lagern sich diese aneinander an. Dabei werden beide DNA Fragmente durch das Enzym Ligase durch eine Esterbindung zwischen einem Phosphatrest und der Desoxyribose verknüpft (Weiss B. 1967).

#### **2.1.8 Transformation**

Die Transformation beschreibt die Aufnahme von DNA in Prokaryonten. Prokaryonten haben von Natur aus die Fähigkeit DNA aufzunehmen; man kann sie in dieser Eigenschaft kompetenter machen, indem man sie einer Behandlung mit Calciumchlorid

aussetzt, dabei lagern sich Calciumchlorid Kristalle auf der Oberfläche der Zellen ab, die deren Zellwand durchlässiger machen. Durch die Inkubation dieser kompetenden Zellen mit DNA für ca 40 sec. bei 40°C besteht die Möglichkeit der Aufnahme der DNA in die Zelle. Die Aufnahme selbst ist vermutlich bedingt durch einen Ausdehnungseffekt und Kontraktionseffekt beim Hitzeschock und anschließenden Abkühlen auf Eis. Die dabei aufgenommene DNA wird vom Prokaryonten reproduziert und wird Teil dessen Proteinbiosynthese (Avery OT. 1944).

#### **2.1.8.1 Plasmidamplifikation *in vivo*, *Escherichia Coli* Kultivierungsbedingungen**

Zur Amplifikation von größeren Mengen Plasmiden zur Präparation von DNA und deren Transfektion in Eukaryontische Zellen diente das Darmbakterium *E. coli*.

*E. coli* hat sich seit seiner Entdeckung im Jahr 1886 zu einem der wichtigsten „Werkzeuge“ der modernen Biotechnologie entwickelt (Escherich T. 1886).

Es gilt als eines der am besten untersuchten Lebewesen überhaupt. *E. coli* dient heute in nahezu jedem Genlabor der Welt zur einfachen, schnellen, kostengünstigen und für den Menschen ungefährlichen Plasmidamplifikation *in vivo*. Zur Plasmidamplifikation wird das zu amplifizierende Plasmid in kompetente *E. coli* Zellen transformiert. Die Fermentation des *E. coli* ist in einem Reagenzglas, bei 37°C und leichtem Schütteln in LB-Medium möglich (Bertani G. 1951).

**Tab.: 2.2: Die Zusammensetzung von Luria Bertani Medium**

	Konzentration [g/L]
Hefeextrakt	5
Trypton	10
Natriumchlorid	0,5

#### **2.1.9 Einzelklonselektion**

Zur Selektion von *E. coli* positiven Klonen nach einer erfolgten Transformation wurden diese auf Agarplatten ausgespatelt, die neben Agar Agar und LB-Medium das Antibiotikum Ampicillin in einer Konzentration von 50 µg/mL enthielten.

Das zuvor in die *E. coli* Zellen transformierte Klonierungs-oder Expressionsplasmid enthielt eine Resistenz gegen Ampicillin, so dass auf der Agarplatte nur *E. coli* Zellen



wachsen konnten, die das Plasmid aufgenommen hatten und es in einer ausreichend hohen Plasmidkopienzahl in der Zelle hielten um gegen das Antibiotikum resistent zu bleiben.

#### **2.1.10 Aufreinigung von Plasmid DNA (Qiagen Kit 8 Vakuum tube)**

Die Aufreinigung von *in vivo* amplifizierter Plasmid DNA aus *E. coli* Kulturen erfolgte durch das *Qiagen Miniprep kit*. Dazu wurden 4 mL *E. coli* Kultur durch Zentrifugation vom Überstand getrennt. Dem Kit liegen die Techniken eines Zellaufschlusse durch alkalische Lyse zu Grunde, gefolgt von einer hydrophilen Interaktionschromatographie mit Kieselgel als Liganden. Die Plasmid-DNA liegt nach einer Aufreinigung durch das Kit in Konzentrationen zwischen einhundert- und vierhundert µg/mL DNA in einem Volumen von 50 µL vor (McOrist AL. 2002).

#### **2.1.11 DNA Sequenzierung**

Die DNA Sequenzierung erfolgte extern bei der Fa. MWG Eurofins GmbH.

Die von der Fa. MWG Eurofins GmbH angewandte Methode basiert auf der Kettenabbruchmethode (Sanger F. 1977). Bei dieser Methode amplifiziert man das zu sequenzierende DNA Fragment durch eine Polymerase und der Zugabe von dNTPs und durch markierte ddNTPs. Diese *Kettenabbruch*-ddNTPs besitzen keine 3'-Hydroxygruppe: Werden sie in den neu synthetisierten DNA-Strang eingebaut, ist eine Verlängerung der DNA durch die DNA-Polymerase nicht mehr möglich, da die OH-Gruppe am 3'-C-Atom für die Verknüpfung mit der Phosphatgruppe des nächsten Nukleotids fehlt. In der Folge entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, die in jedem Ansatz stets mit dem gleichen ddNTP enden (also nur mit A oder C oder G oder T). Die dabei entstandenen Fragmente werden elektrophoretisch getrennt und durch die markierten ddNTPs detektiert.

## **2.2 Zellkulturtechnische Methoden**

### **2.2.1 Verwendete Zelllinien und deren Kultivierung**

Zur Expression der verschiedenen Albuminmutanten und des FcRn wurden die Zelllinien HEK 293 und CHO verwendet.

Die Zelllinie HEK 293 ist ein Transformationsprodukt einer embryonalen humanen Zelllinie und Adenoviren. Sie ist eine adhärenz wachsende Epithelzelle, die sich bei 37°C und serumfrei in einer Vielzahl von chemisch definierten Medien kultivieren lässt (zur Hausen H. 1967). Die Zelllinie CHO ist dagegen eine in Suspension wachsende Kultur. Sie ist eine immortalisierte Zelllinie aus Ovarien des chinesischen Hamsters (Puck TT. 1958). Seit ihrer Entwicklung sind aus dieser Primärkultur zahlreiche Zelllinien hervorgegangen, sie ist mittlerweile die am weitesten verbreitete Zelllinie überhaupt; über 70% aller rekombinant hergestellten therapeutischen Proteine werden in CHO produziert (Wurm F. 2004). Das Medienangebot an chemisch definierten und serumfreien Medien ist demnach sehr groß. Die Kultivierung beider verwendeter Zelllinien fand nahezu bei identischen Bedingungen statt; beide wurden nach der Transfektion von „12-Well Platten“ ausgehend in entsprechend größerem Kultivierungsgefäße verdünnt, dabei wurden die Zellkulturen nie mehr als eins zu drei mit frischem Medium verdünnt. Zum Aufbau eines sog. *seedtrains* wurden beide Zelllinien in folgenden Kultivierungsgefäßen auf ein Inokulum für einen komplexen Fermenter in Brutschränken bei 6,5% CO<sub>2</sub> und einer Temperatur von 37°C kultiviert: „12-96 Well-Platten“, T25-T175-Flaschen, Rollerflaschen und Schüttelkolben. Bei der verwendeten HEK-293 Zelllinie handelt es sich um eine schwach adhärierende Zelllinie, was ein einfaches Ablösen der Zellen durch Schütteln des Gefäßes ermöglicht und aufwändigere Trypsinierungen erspart.

### 2.2.2 Transfektion von DNA in HEK-und CHO-Zellen

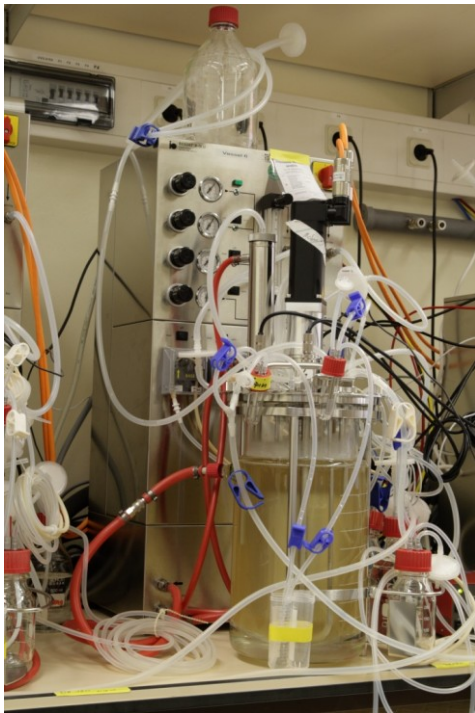
Die Transfektion ist definiert als das Einbringen von fremder DNA in Säugerzellen. Das durch Lipofektion oder Elektroporation eingeschleuste Expressionsplasmid integriert sich häufig nicht stabil ins Genom der Säugerzelle. Zur stabilen Transfektion wird deshalb ein Selektionsdruck in Form eines Antibiotikums eingesetzt, wodurch die Integration des zu exprimierenden Gens sichergestellt wird. Der Selektionsmarker ist eine zusätzlich zum gewünschten Protein exprimierte Puromycin-N-acetyltransferase (PAC) oder Neomycin-N-acetyltransferase (NAC), welche die Zelle vor einer Wachstumshemmung durch das Antibiotikum schützt.

Ist das Gen durch Selektionsdruck stabil ins Zellgenom integriert worden, kann auf den Selektionsdruck verzichtet werden. Bei der Verwendung des Verfahrens der Lipofektion wird durch Zugabe von Lipofektaminreagenz die Plasmid-DNA darin eingelagert und in den Zellkern endozytiert. Zur Selektion der Zellen mit integriertem Gen wurde Puromycin oder Neomycin eingesetzt. Eine andere Möglichkeit zur

Transfektion stellt die Elektroporation dar, hierbei wird durch anlegen einer Spannung die Ladung der Zellwände beeinflusst, wodurch der Vektor in die Zelle gelangen kann. Ein Selektionsdruck in Form einer Antibiotikaresistenz ist auch hierbei notwendig (Klenchin .A. 1991). Die verwendeten Expressionsplasmide sind im Anhang aufgeführt (vgl 7.5.1 und 7.5.2.)

### **2.2.3 Die Produktion rekombinanter Proteine im Zellkultur-Fermenter**

Die Produktion der mutierten Albumine wie auch des FcRn erfolgte durch die Kultivierung der CHO- und HEK-Zellkulturen in komplexen Fermentern. Komplexe Fermentationsanlagen wie die verwendeten *Biostat DCUs* von der Fa. Sartorius, erlauben die Steuerung einer Vielzahl von Parametern um den zu fermentierenden Zellen optimale Wachstumsparameter zu bieten. Ein moderner Zellkulturfermenter erlaubt neben der Steuerung der Kesseltemperatur über einen wasserbefüllten Doppelmantel, einen Gaseintrag von Stickstoff, Sauerstoff und Kohlendioxid sowohl durch Eintrag in den Kopfraum, als auch durch die Ringbrausenbegasung. Die Durchmischung des Reaktorinhalts erfolgt durch einen magnetgekoppelten Rührer. Die aus Glas bestehenden Kessel haben ein Fermentationsvolumen von fünf bis zwanzig Litern und sind autoklavierbar. Während einer Fermentation werden einige Parameter *online* aufgezeichnet und *in situ* bestimmt; dazu gehören die Temperatur der pH-Wert, der Sauerstoffpartialdruck und der Kohlendioxidgehalt in der Abluft. Die Bestimmung anderer wichtiger Fermentationsparameter erfolgte in externen Geräten (Chmiel H. 2005).



**Abb. 2.2: Ein klassischer 10L Glaskesselfermenter im laufenden Produktionsprozess**

Neben Fermentationsanlagen klassischer Architektur wurden auch moderne Fermenter zur Produktion verwendet. Das *Wave-System* der Fa. GE Healthcare unterscheidet sich vom klassischen Rührkessel-Bioreaktor aus Glas durch einen aus mehreren Schichten verschiedener Kuststoffe bestehenden Einweg-Kultursack. Die Kultur wird nicht durch einen Rührer durchmischt, sondern die Durchmischung und der Gaseintrag erfolgt durch ein Schwenken des Kultursacks auf einer beheizten Platte. Der Vorteil dieses Systems liegt in der Zeitersparnis beim Auf- und Abbau der Anlage, bedingt durch den Einweg Fermentiersack. Nachteile gegenüber dem klassischen Rührkesselfermenter liegen in der mangelnden Flexibilität der Anschlussmöglichkeiten von Sonden und des Probennahmesystems (Singh V. 1999).



Abb. 2.3: Das WAVE 20/50 Fermentersystem im laufenden Prozess

Das hier primär angewendete *repeated batch* Verfahren konnte in beiden verwendeten Fermentertypen angewendet werden. Dieser mehrstufige Produktionsprozess unterscheidet sich vom *batch* Verfahren durch die mehrmalige Ernte und Neubefüllung eines Fermenters unter Rückhaltung eines Teils der ausgewachsenen Kultur. Das Verfahren hat gegenüber der *batch* Fermentation den Vorteil, dass der bei der Ernte zurückgehaltene Teil der Kultur als Inokulum für den folgenden *batch* dient und die Zellen an den Prozess adaptiert sind; dadurch entfällt hierbei die bei einer *batch* Fermentation anfallende „lag –Phase“ und es kann in kürzerer Zeit mehr produziert werden.

Die Analytik für den Fermentationsprozess wichtiger Parameter erfolgte neben den *in situ* Messungen in einem automatisierten Analysegerät, durch das *Bioprofile FLEX* der Fa. Novamedical. Moderne Zellzähl- und Analysegeräte sind in der Lage, in weniger als fünf Minuten neben der Tot- und Lebendzellzahl den Glukose- und Laktatgehalt, für das Zellwachstum essentielle Aminosäueren wie z. Bsp. Glutamin und andere Metabolite wie Ammonmiak und Kalzium zu messen. Diese Automatisierung erlaubt einen wesentlich höheren Probendurchsatz als analoge Methoden, wie zum Bsp. die Zellzahlbestimmung in der Zählkammer mit einer Vitalbestimmung durch eine Trypanblau Färbung. Die Analytik der Produktkonzentration wurde durch ELISA bestimmt (vgl. Kap.: 2.4.3)

## 2.3 Methoden zur Proteinaufreinigung

Zweck der Proteinaufreinigung ist die Isolierung des produzierten Zielproteins aus dem Zellkulturüberstand sowie die Ankonzentrierung und Überführung in stabile Lagerbedingungen.

### 2.3.1 Auftauen und Filtrieren des Zellkulturüberstandes

Bereits bei der Ernte der Fermenter wurden die im Überstand befindlichen Zellen durch einen speziellen Zellfilter vom Überstand abgetrennt; Überstände wurden bei -20°C gelagert. Die nach der Fermentation eingefrorenen Überstände lagen in 5 L bis 25 L Säcken vor und wurden bei 37°C im Wasserbad in einem Zeitrahmen von 0,5 bis 2h aufgetaut. Anschließend wurden die aufgetauten Überstände mithilfe eines Sterilfilters mit einem „cut off“ von 0,22 µm filtriert, um beim Einfrieren oder Auftauen entstandene Schwebepartikel zu entfernen.

Schwebepartikel größer 0,22 µm stören in weiteren Reinigungsschritten und können in der Membran einer Diafiltrationsanlage oder einer Säulenmatrix zusetzen und sie stark beschädigen.

### 2.3.2 Ankonzentrierung von Überständen

Die Ankonzentrierung des Zielproteins im Überstand erfolgte mittels einer Diafiltrationsanlage.

Bei der Diafiltration wird der Überstand zirkulierend an einer Membran entlang gepumpt. Durch eine Verjüngung am Schlauch des Retentat-Austritts entsteht der transmembrane Druck, durch diesen werden Moleküle kleiner als der „cut off“ der Membran durch diese gepresst. Die Ankonzentrierung der Überstände um einen Faktor zehn ist für das hergestellte Zielprotein Albumin unbedenklich.

### 2.3.3 Chromatographie

Der rekombinant exprimierte und von Zellen befreite Überstand wurde im Anschluss an die Fermentation oder nach Auftauen des eingefrorenen Überstands aufgereinigt. Durch die Reinigung wurden störende Bestandteile des Kulturmediums, wie Detergenzien und Fremdproteine, von den gewünschten Proteinen separiert. Für die Proteinreinigung und Ankonzentrierung sind präparative Säulenchromatographietechniken geeignet. Die zu reinigende Substanzmischung wird

in Abhängigkeit vom Laufpuffer und Säulenmaterial in seine verschiedenen Komponenten aufgetrennt. Das fraktionierte Eluat enthält die aufgetrennten Komponenten entsprechend ihrer Retention.

#### **2.3.3.1 Metallchelat Affinitätschromatographie**

Der FcRn ist bei der Klonierung mit einem hexameren his-taq markiert worden, um diesen durch Metallchelat-Affinitätschromatographie aufzureinigen.

Das Prinzip der Metallchelat-Affinitätschromatographie beruht auf einer Komplexbildung zwischen einem zweiwertigem Metall-Kation und dem Imidazolring der Aminosäure Histidin. Dabei wird ein zweiwertiges Metallion, meist Kupfer oder Nickel, durch Komplexbildung an einen Komplexbildner, wie z. Bsp. Nitrilotriessigsäure oder Iminodiessigsäure, immobilisiert und dient als Ligand für Histidin markierte Proteine, als Elutionsmittel wird Imidazol eingesetzt, welches mit dem Imidazolring der Histidine um den immobilisierten Metallliganden konkurriert (Jerker P. 1975).

#### **2.3.3.1 Immunoaffinitätschromatographie**

Die Immunoaffinitätschromatographie ist zweifelsohne die spezifischste Form der Chromatographie, Reinigungsfaktoren von tausend; bei Ausbeuten von über 50% und mehr sind möglich. Sie bedient sich der Affinität zwischen Antikörper und Antigen. Zur Elution dieser Bindung nutzt man die Ladungsänderung des Proteins bei unterschiedlichen pH-Werten. Dabei kann das Zielprotein kurzfristig sehr extremen pH ausgesetzt werden, was die Elution in einen Neutralisationspuffer notwendig macht. In der vorliegenden Arbeit wurde ein monoklonaler Antikörper gegen Albumin an Bromcyan-aktivierte Sepharose immobilisiert; Albumin wurde durch einen Glycinpuffer bei pH 3 eluiert, das Eluat wurde direkt in einem Neutralisationspuffer bei pH 7,3 aufgefangen.

## 2.4 Proteinanalytische Methoden

### 2.4.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist eine qualitative proteinanalytische Methode. Durch die Zugabe eines Detergenz zu dem zu analysierenden Proteingemisch, welches die Eigenladung der Proteine überdeckt und diesen eine konstante negative Ladung verleiht, entspricht die Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld deren Größe (Laemmli 1970).

Die Proben werden vor der Applikation auf das Polyacrylamidgel auf 95°C erhitzt, um die Wasserstoffbrückenbindungen zu spalten und dadurch die Sekundärstruktur der Proteine aufzulösen. Optional kann die Probe zusätzlich mit einem Reduktionsmittel wie z. Bsp  $\beta$ -Mercaptoethanol oder Dithiothreitol behandelt werden, um die für Tertiärstruktur verantwortlichen Disulfidbrücken zu spalten.

Die Proteine können in dem dabei verwendeten Polyacrylamidgel wahlweise mit Coomassie-Brillant-Blau, mit Nachweisgrenze 100 ng Protein pro Bande oder mit Silber, mit einer Nachweisgrenze von bis zu 1 ng Protein pro Bande angefärbt werden.

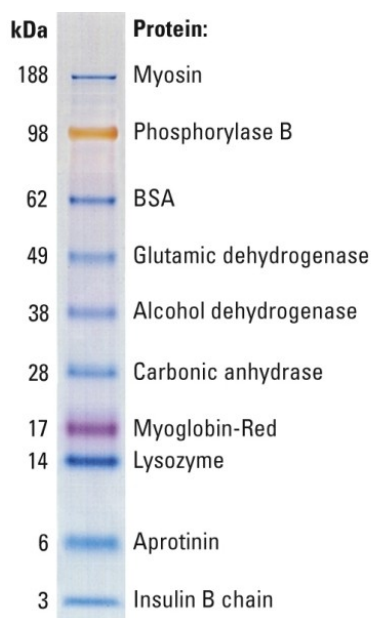


Abb. 2.4.:

Zur Bestimmung der Banden wurde der Größenmarker „Seebblue Plus 2 von der Fa. Invitrogen“ eingesetzt.



### **2.4.2 Westernblott**

Der Westernblott ist eine Methode die es ermöglicht, ausgehend von einer getätigten SDS-PAGE die im Gel aufgetrennten Proteine auf eine Membran zu übertragen. Das bei der SDS-PAGE erzeugte Muster der Auftrennung bleibt dabei erhalten. Durch Auswaschen des SDS können sich die auf der Membran immobilisierten Proteine partiell zurückfalten (Towbin H. 1979).

Die Proteine können spezifisch über einen ersten Antikörper auf der Membran detektiert werden. Durch einen zweiten gegen den ersten gerichteten, mit einem Enzym markierten Antikörper, welches ein Substrat durch eine Farbreaktion umsetzt, können Proteine spezifisch in Banden sichtbar gemacht werden. Neben der hohen Spezifität liegt der Vorteil der Immundetektion in ihrer sehr hohen Sensitivität, die die einer Silberfärbung noch übersteigt.

### **2.4.3 Enzyme Linked Immunosorbent Assay ELISA**

Der ELISA ist eine qualitative proteinanalytische Methode, mit der die Konzentration eines in Lösung befindlichen Proteins selektiv bis zu einer Nachweisgrenze von 0,1 ng/mL bestimmt werden kann (Engvall E. 1971). In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich ein anti Albumin ELISA zur Bestimmung des Albumingehalts in Überständen aus der Fermentation oder Aufreinigungsanalytik eingesetzt. Zur Bestimmung des Albumingehalts einer Probe wurde ein polyklonaler Antikörper auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert und mit der Probe oder dem Standard (Human Plasma) inkubiert. Die Detektion erfolgte über einen Enzym markierten polyklonalen anti-Albumin Antikörper aus einer anderen Spezies als der zuvor auf der Mikrotiterplatte gebundene. Das Enzym an dem zweiten Antikörper setzt ein Substrat um, welches dabei seine Farbe ändert; die Konzentrationen der Proben können durch photometrische Messungen ermittelt werden, indem die Intensitäten der Färbung mit der der Standardreihe in Bezug gesetzt werden.

### **2.4.4 CD-Spektren und Schmelzpunktanalyse**

Die Circular dichroismus-Spektroskopie ist eine Analysemethode, die zur Analyse der Sekundärstruktur sowie zur Bestimmung der thermischen Stabilität von Proteinen eingesetzt wird. Messungen im UV-Bereich zwischen 250 - 190nm ermöglichen Aussagen über die Sekundärstruktur eines Proteins. Zur Anwendung der Methode bedarf es allerdings einer Referenz, so dass die Methode einen Vergleich zweier

Proteine auf identische Faltung ermöglicht. Die Messung basiert auf dem Effekt, dass zirkular polarisiertes Licht von optisch aktiven Proben, je nachdem ob es rechts zirkular polarisiert oder links zirkular polarisiert ist, unterschiedlich stark absorbiert wird. Auch die Sekundärstruktur von Proteinen hat auf dieses Absorptionsverhältnis Einfluss, so dass mittels CD-Spektroskopie Analysen der Sekundärstruktur gemacht und Schmelzkurven bestimmt werden können (Greenfield NJ., 1996).

Die Messungen wurden am Spectropolarimeter J-810 (Jasco) mit einer Quarzküvette mit 1 mm Schichtdicke (Hellma) durchgeführt. Die vermessenen Proteinlösungen wiesen Konzentrationen von 75 µg/mL auf. Spektren des fernen-UV-Bereichs wurden bei einer Temperatur von 25°C aufgezeichnet.

#### 2.4.1 Schmelzpunktanalyse

Zur Bestimmung der Schmelzpunkte der Albuminmutanten wurde die Probe auf 95 °C erhitzt und anschließend wieder auf 25 °C abgekühlt, mit einer Temperaturänderung von 2 °C/min. Dabei wurde der Circular dichroismus an der Wellenlänge 226 nm beobachtet, einem für ein stark  $\alpha$ -helikal gefaltetes Protein, wie Albumin signifikanten Bereich.

Die gemessenen Werte wurden an Hand der folgenden Gleichung in die molare Elliptizität übertragen um die Aussagen vom Molekulargewicht des Proteins und der Schichtdicke der Probe unabhängig darzustellen (Kelly SM., 2000).

$$[\theta](\lambda) = (\theta(\lambda) \cdot M) / ((n-1) \cdot 10 \cdot c \cdot l) \quad (1.1)$$

$[\theta]$  = molare Elliptizität,

$\theta$  = gemessene Elliptizität

M = Molmasse des Proteins

n = Anzahl der Peptidbindungen

c = Konzentration des Proteins [g/mL]

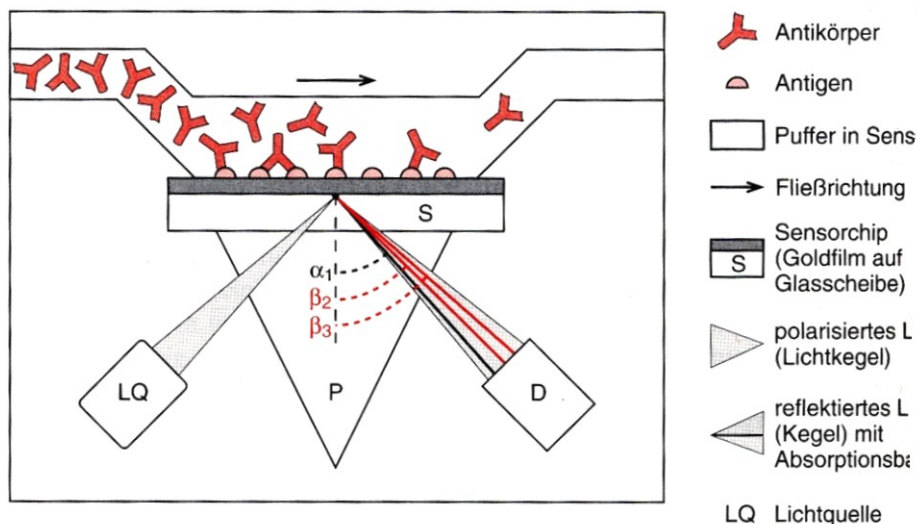
l = Schichtdicke [cm]

## 2.5 Methoden zur Bestimmung von Bindungen

### 2.5.1 Die Oberflächen-Plasmonen-Resonanzspektroskopie

Die Oberflächen-Plasmonen-Resonanzspektroskopie ist eine Methode zur Messung von Bindungsvorgängen an Oberflächen. Das Spektrum der Anwendung ist sehr vielfältig, man kann mittels SPR Bindungen zwischen Enzymen und Substraten, zwischen Bakterien und Antikörpern, zwischen Proteinen zu DNA und zwischen diversen Proteinen untereinander Bindungen charakterisieren.

Die Vorteile der SPR liegen in der Sensitivität, der hohen Zeitauflösung, labelfreier Detektion, Spezifität und der Minimierung mechanischer Einflüsse auf die Probe. Zur Charakterisierung der Bindungseigenschaften zweier Bindungspartner wird einer der Beiden auf einer Oberfläche kovalent gebunden und mit dem Anderen in der mobilen Phase befindlichen in Kontakt gebracht. Das dabei eingesetzte Prinzip zur Messung der Bindungseigenschaften basiert auf der Oberflächenplasmonresonanz. Die SPR beruht auf der Änderung des Reflexionswinkels von polarisiertem Licht auf der Glasinnenseite durch ein Plasmon eines Goldfilms als Funktion der Menge von Proteinen die sich auf der Rückseite des Goldfilms befinden.



**Abb. 2.5:** Schematische Darstellung, einer SPR Flusszelle, durch den bindenden Antikörper erhöht sich die Schichtdicke, die einen direkten Einfluss auf den Reflexionswinkel hat.

### 2.5.1.1 Immobilisierung von Proteinen an Dextranfäden

Die Immobilisierung von Proteinen an Dextranfäden erfolgte durch die Kopplung freier Amine des Proteins an eine Carbonsäure an der Dextranmatrix. Mit NHS und EDC wird die Carbonsäure in einem ersten Schritt mit NHS verestert; die Carbonsäure ist dadurch aktiviert und kann leicht mit einem freien Amin des Proteins reagieren.

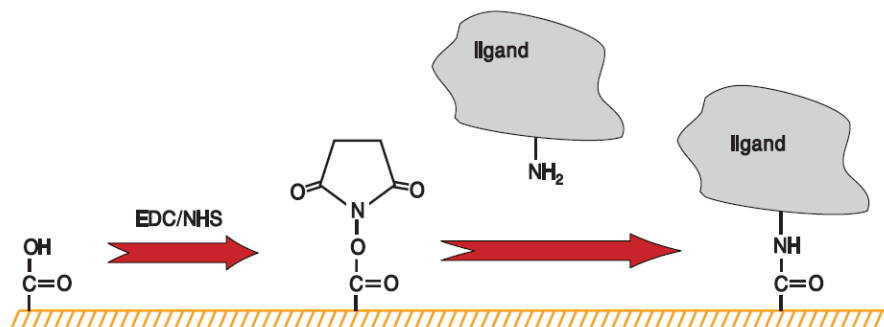


Abb. 2.6:

Immobilisierung eines Proteins, N-terminal an eine Dextranoberfläche am CM-3 chip (GE-Healthcare 2008).

### 2.5.1.2 Die Assoziation und Dissoziation von Proteinen

Die Bindung eines Proteins in einer mobilen Phase zu einem an einem SPR-Chip immobilisierten können in Echtzeit über die Änderung der Schichtdicke und den davon abhängigen Brechungsindex des linear polarisierten Lichts optisch dargestellt werden.

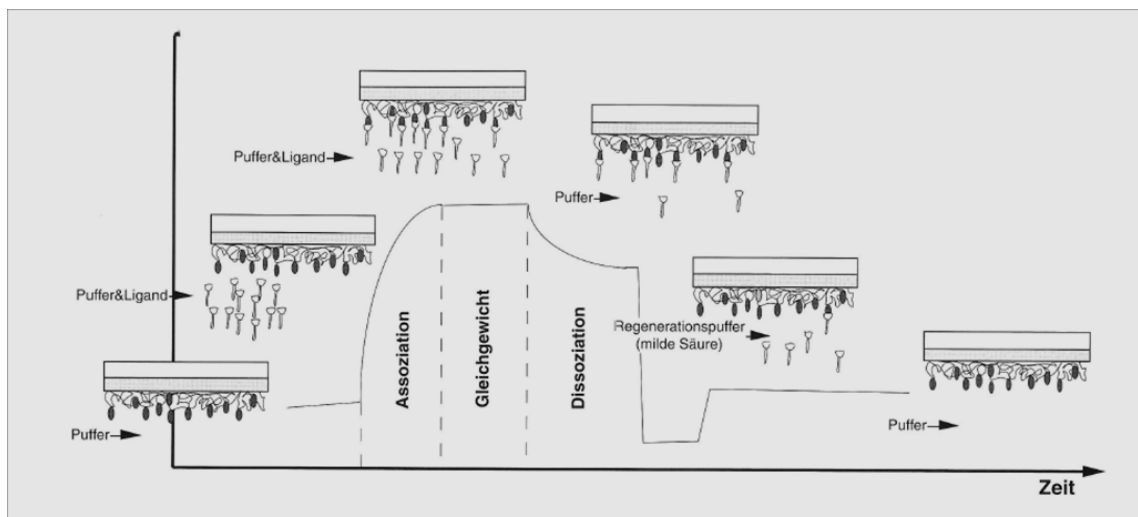


Abb. 2.7:

Schemenhafte Darstellung einer Assoziation und Dissoziation eines immobilisierten Proteins und eines in der mobilen Phase.

Durch die Applikation eines Proteins in Lösung nimmt die Schichtdicke in einer ersten Phase exponentiell zu, in einer zweiten Phase der Bindung verlangsamt sich die Zunahme der Schichtdicke bis zu einer Einstellung des Gleichgewichtes, des in der mobilen Phase befindlichen Analyten und des immobilisierten Liganden. Durch die Applikation von Puffer ohne Proteine dissoziiert der Analyt vom immobilisierten Liganden zunächst exponentiell ab, dann bis zur erneuten Einstellung eines Gleichgewichts etwas langsamer. Die Schichtdicke hat wieder etwas abgenommen. Die Tangentensteigung während der exponentiellen Zunahme der Schichtdicke sowie die der exponentiellen Abnahme der Schichtdicke sind neben der Konzentration des Analyten und der maximalen Signalthöhe zwei wichtige Parameter zur Berechnung der Assoziations- und Dissoziationskonstanten.

### 2.5.1.3 Berechnung von Bindungskinetiken

Die Bindung zweier Moleküle zu einander findet in Form eines kontinuierlichen Prozesses statt; dabei stellt sich mit der Zeit durch die ständige Bildung zweier Edukte zu einem Komplex und dem ständigen Zerfall des Komplexes in dessen Edukte ein Gleichgewicht zwischen den Edukten und dem Produkt ein.



Die Geschwindigkeit der Einstellung des Gleichgewichtes bei der Komplexbildung lässt sich durch die Geschwindigkeitskonstante  $k_a$  darstellen; die Geschwindigkeit der Einstellung des Gleichgewichtes bei dem Zerfall des Komplexes lässt sich durch die Geschwindigkeitskonstante  $k_d$  darstellen. Aus den Verhältnissen der Geschwindigkeitskonstanten errechnen sich die Gleichgewichtskonstanten.

$$K_A = \frac{k_a}{k_d} = \frac{AL}{A \cdot L} \quad (2.2)$$

Die Gleichgewichtskonstante der Assoziation  $K_A$  [ $M^{-1}$ ] beschreibt die Tendenz eines Moleküls zu einem Anderen zu binden, je größer der  $K_A$  Wert desto höher ist die Affinität des Analyten zu einem Liganden.

$$K_D = \frac{k_d}{k_a} = \frac{A \cdot L}{AL} \quad (2.3)$$

Die Gleichgewichtskonstante der Dissoziation  $K_D$  [ $M$ ] beschreibt die Tendenz eines Moleküls sich von einem anderen zu lösen, je kleiner der  $K_D$  Wert desto höher ist die Stabilität des Bindungskomplexes zweier Moleküle.

Die Berechnungen der Assoziations- und Dissoziationskonstanten erfolgte durch die „initial rate analysis“ nach der Arbeit von (Edwards P. 1997).

Edwards setzt dabei ein Zweiphasenmodell einer Bindung zwischen einem immobilisierten Liganden und einem mobilen Analyten voraus. In einer ersten Phase findet eine schnelle linear verlaufende Bindung vom Analyt zu Ligand statt, gefolgt von einer zweiten langsameren Phase die nicht linear verläuft.

Nimmt man ein SPR Diagramm zur Grundlage dieser Berechnungen, kann man die Geschwindigkeitskonstante des Bindungsvorgangs anhand linearer Regression bestimmen. Auf Grund der Immobilisierung des Liganden ist dessen Konzentration im Verlauf der Bindung als konstant anzusehen. Die Geschwindigkeitskonstante des Bindungsvorgangs der ersten Phase ist somit nur abhängig von der Konzentration des Analyten:

$$\frac{dR}{dt} = \frac{R_{max}[L]}{K_D + [L]} (k_a [L] + k_d) = R_{max}[L] k_a \quad (2.4)$$

Daher resultiert aus dem graphischen Auftrag von  $[dR/dt]$  gegen  $[L]$  in eine Gerade. Die Steigung dieser ist gemäß der genannten Gleichung das Produkt der Assoziationskonstante  $k_a$  und der maximalen Bindungskapazität des immobilisierten Liganden  $R_{max}$ .

$$\text{Steigung des Graphen } \frac{dR}{dt} \cdot [L] = R_{\max} \cdot k_a \quad (2.5)$$

Durch Auflösen dieser Gleichung nach  $k_a$  kann man die Geschwindigkeitskonstante  $k_a$  berechnen.

Um die Geschwindigkeitskonstanten der Dissoziation  $k_d$  zu berechnen, wurden die Diagrammdaten aus der Dissoziationsphase in folgende Gleichung eingesetzt:

$$R_t = R_0 e^{-k_d \cdot t} \quad (2.6)$$

Durch Umstellen dieser Gleichung nach  $k_d$  ist ersichtlich, dass aus dem graphischen Auftrag von  $\ln R_0/R_t$  gegen  $t$  eine Gerade resultiert, deren Steigung  $k_d$  entspricht.

(Mazumdar S. 2008). Aus den berechneten  $k_d$  - und  $k_a$  Werten kann man wie zuvor in den Gleichungen (2.2) und (2.3) beschriebenen die Assoziationskonstante  $K_A$  und die Dissoziationskonstante  $K_D$  berechnen.

## 2.5.2 Tierversuche

Sämtliche getätigten Tierversuche, sowie die Tierhaltung wurden entsprechend den gesetzlichen Richtlinien durchgeführt. Dabei wurden so wenige Tiere wie möglich eingesetzt und sichergestellt, dass diesen kein unnötiges Leid zugefügt wurde.

### 2.5.2.1 Applikation von Proteinen und Probennahme

Der Versuchsaufbau zur Erstellung einer Abbaukinetik gestaltete sich wie folgt: Zum Testen einer Albuminvariante wurden vier Ratten benötigt, diese wurden in zwei Gruppen mit jeweils zwei Tieren aufgeteilt. Jedem Tier wurden 62  $\mu\text{g}$  der jeweiligen Albuminvariante appliziert. Die Blutentnahmen fanden im Zeitrahmen von fünf, dreißig, neunzig Minuten, vier und acht Stunden und von da an einmal täglich bis zum fünften Tag statt. Dabei wurde den Gruppen abwechselnd Blut abgenommen, um diese insbesondere während der kurzen Intervalle am ersten Tag nicht zuviel Blut abzunehmen. Die Proben wurden unmittelbar nach der Entnahme zentrifugiert, das Plasma im Überstand wurde mit Zitratpuffer versetzt, um die Gerinnung zu hemmen, und anschließend bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren. Die Proben derselben Gruppe wurden nach

auftauen bei RT *gepoolt* und im ELISA gegen einen Standard der applizierten Substanz gemessen. Die dabei gemessenen Konzentrationen eines jeden getesteten Albuminklons wurden prozentual gegen die applizierte Dosis sowohl linear und als auch halblogarithmisch aufgetragen (vgl. Anhang Kap.: 7.8). Aus den dabei gemessenen Konzentrationen wurden zur Charakterisierung der Bindungen die Wiederfindungsraten, die Halbwertszeit, die Eliminierungsrate und die Bioverfügbarkeit berechnet und ausgewertet.

#### **2.5.2.2 Die Berechnung der Halbwertszeit Wiederfindungsrate, Bioverfügbarkeit und der Eliminationsgeschwindigkeitskonstante**

Die Wiederfindungsrate entspricht dem prozentualen Anteil der nachgewiesenen Konzentration nach fünf Minuten, ausgehend von der applizierten Dosis.

Die Halbwertszeit ist die Zeit, nach der die Hälfte eines applizierten Stoffes im Tier noch nachgewiesen werden kann, ausgehend von der Konzentration der Wiederfindungsrate.

Die Eliminationsgeschwindigkeitskonstante ( $k_e$ ) beschreibt den Abbau eines applizierten Stoffes in Abhängigkeit von der Zeit,  $k_e$  wurde wie folgt berechnet:

Ausgehend davon, dass der Abbau eines Stoffes im Tier einer Reaktion erster Ordnung entspricht, gilt nach (Langguth P. 2004):

$$v = \frac{d[A]}{dt} = k_e [A] \quad (2.7)$$

Durch Integration erhält man:

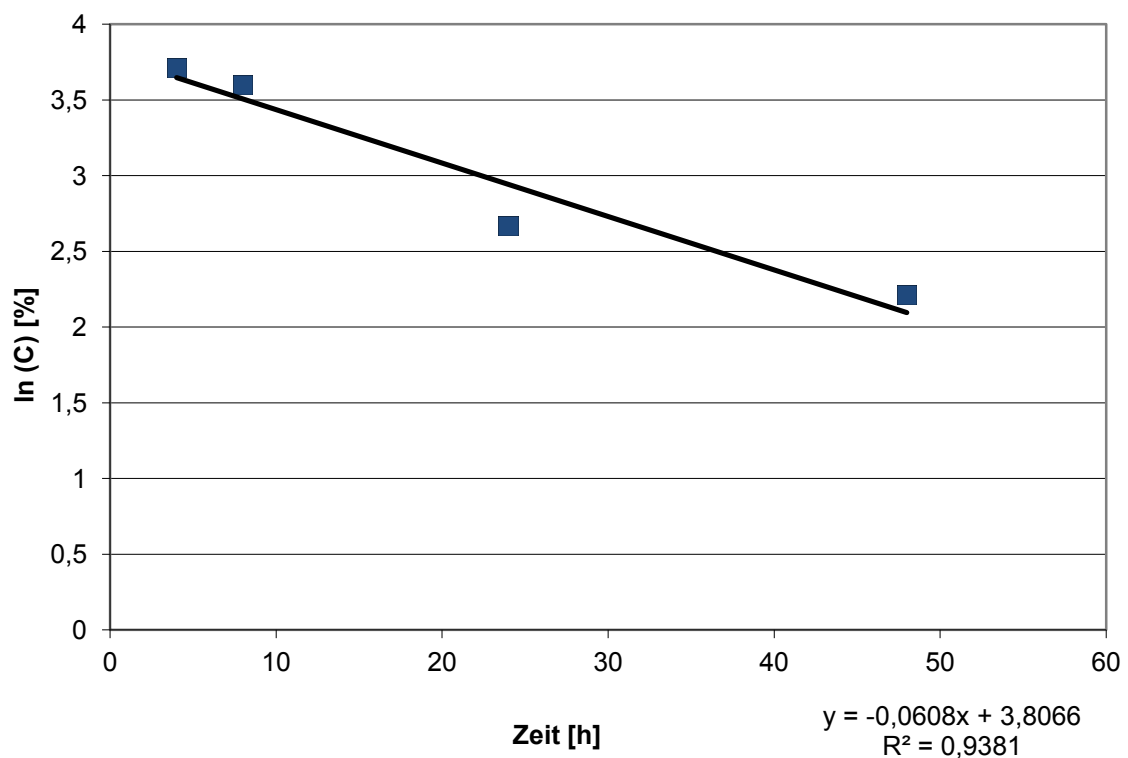
$$[A]_t = [A]_0 \cdot e^{-k_e \cdot t} \quad (2.8)$$

Durch Logarithmieren erhält man.

$$\ln C(t) = \ln C(0) - k_e t \quad (2.9)$$



In der Geradengleichung entspricht  $\ln C(0)$  dem Schnittpunkt mit der Ordinate und  $k_e$  der negativen Steigung. Die Berechnung von  $k_e$  und  $\ln C(0)$  erfolgte über lineare Regression der logarithmierten Messpunkte:



**Abb. 2.8:**

**Lineare Regression von  $\ln C(0)$  gegen die Zeit zur Berechnung von  $k_e$  am Bsp. Wildtyp Albumin**

Der Graph zeigt die lineare Regression von  $\ln C(0)$  gegen die Zeit, die Bestimmung der Steigung ergab  $-0,0608$ , woraus sich Multipliziert mit minus eins eine Eliminationsgeschwindigkeitskonstante von  $0,060$  für Wildtyp Albumin in der Ratte ergibt. Weiter wurde anhand des Schnittpunktes der Regressionsgeraden mit der Ordinate die Wiederfindungsrate bestimmt, indem der Schnittpunkt von  $3,8$  zur Basis  $e$  exponiert wurde. Die Wiederfindungsrate beträgt demnach  $45$  Prozent.

Die Halbwertszeit wurde nach folgender Formel berechnet:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_e} \quad (2.10)$$

Für das hier gezeigte Bsp. von Albumin Wildtyp wurde eine Halbwertszeit von 14 Stunden berechnet.

Die Bioverfügbarkeit ist ein Maß für die Exposition des Tieres gegenüber einer Wirksubstanz und wurde durch die Berechnung der Fläche unter der Plasmaspiegelkurve, zwischen den Zeitpunkten  $t=0$  also der Applikation und dem letzten Messpunkt  $t=t_{\text{ende}}$  bestimmt. Für das hier gezeigte Bsp. betrug diese 662 [h ng/mL].

Sämtliche bestimmten Parameter sind in Kap. 3.4 ausgewertet und diskutiert, Übersichten der Daten sind im Anhang unter 7.8 aufgeführt.

### 3 Ergebnisse

Zur Identifikation einer Bindestelle zwischen dem FcRn und Albumin wurden zwei Ansätze gewählt:

Zum Einen wurden Albuminmutanten hergestellt, bei denen bestimmte von Seiten der Bioinformatik vorgeschlagene Aminosäuren durch Alanine ersetzt wurden. Diese wurden Ratten appliziert und anhand von Proben durch Blutentnahmen, Abbaukinetiken erstellt. Zum Anderen wurde der humane FcRn aus einer Leberbank isoliert und exprimiert, um Bindungskinetiken zwischen diesem und alaninisierten Albuminmutanten im SPR zu erstellen.

#### 3.1 Gentechnische Arbeiten

Zur Charakterisierung der Bindung zwischen dem FcRn und Albumin wurden der humane FcRn und zahlreiche Albuminmutanten hergestellt. Dabei wurden zunächst in der Gensequenz des humanen Albumins mehrere einzelne, fünf bis zwölf Aminosäuren lange Sequenzen durch Alanine ersetzt. Der humane FcRn und seine Subdomäne  $\beta$ -2-Mikroglobulin wurden aus einer cDNA Bank isoliert, der FcRn wurde zur Aufreinigung mit sechs Histidinen versehen.

##### 3.1.1 Herstellung alanisierter rekombinanter Albuminvarianten

Die von Seiten der Bioinformatik (vgl. Kap. 1.5.1.1) vorgeschlagenen, für eine Bindung zum FcRn möglicherweise verantwortlichen Aminosäuresequenzen wurden mittels folgender Klonierungsstrategie durch Alanine ersetzt:

Die Gensequenz durch mehrere aufeinanderfolgende Mutagenesen zu ändern kam auf Grund der Länge von bis zu elf Aminosäuren nicht in Frage. Der zeitliche Aufwand und die Gefahr von ungewollten Mutationen im Plasmid durch zahlreiche Mutagenisierungszyklen waren zu hoch. Stattdessen wurde an den Rändern der veränderten Stellen die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *NheI* mittels Mutagenese eingesetzt. Anschließend wurde das Plasmid mit *NheI* geschnitten, die zu mutagenisierende Sequenz entfernt und ein synthetisch hergestelltes, für die Alaninreste kodierendes Oligonukleotid durch Ligation eingefügt. Das Restriktionsenzym *NheI* wurde bewusst gewählt, weil es die Aminosäuren Alanin und

Serin kodiert. Die von der Bioinformatik vorgeschlagenen Sequenzen wurden demnach nicht durch die gleiche Anzahl an Alaninen substituiert, sondern die letzte zu ersetzende Aminosäure wurde durch ein Serin substituiert.

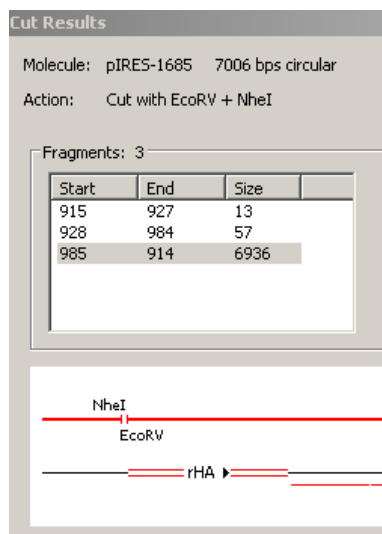
Um die mit ca. 8000 bp sehr großen Plasmide nicht komplett sequenzieren zu müssen, wurde ein möglichst kleiner sequenzierter Bereich um die mutagenisierte Stelle herum mittels Restriktionsenzymen ausgeschnitten und wieder in den ursprünglichen Ausgangsvektor eingefügt.

Der Ausgangsvektor, der die Sequenz des Wildtyp Albumins enthielt, hatte an einer *multiple cloning site* bereits eine Schnittstelle des Restriktionsenzym *NheI*, die durch Restriktion nicht zu entfernen war. Vor Beginn der Mutagenesen musste diese entfernt werden und der Vektor so für die folgenden Mutagenesen angepasst werden.

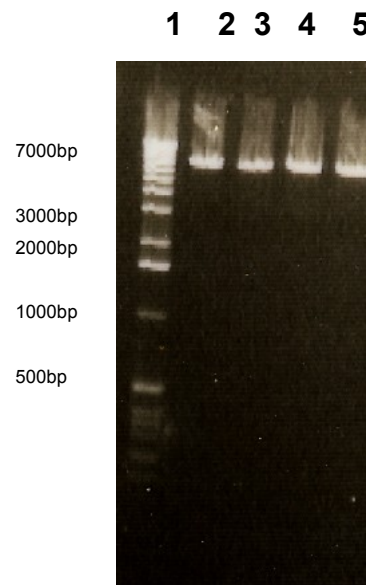
#### **3.1.1.1 Die Vorbereitung des Klonierungsvektors**

Um die folgenden Mutationen in der Albuminsequenz durchzuführen wurde die im Expressionsvektor 1645 (s.h. Kap. 7.4) bereits vorhandene *NheI* Schnittstelle entfernt. Der Vektor 1645 wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRV* und *NheI* geschnitten. (vgl. Kap. 2.1.2)

Dabei hat das Enzym *EcoRV* ein glattes Ende und *NheI* einen 5' Überhang erzeugt.



**Abb. 3.1.: Schnittmuster pMARES 1685 mit EcoRV und NheI**



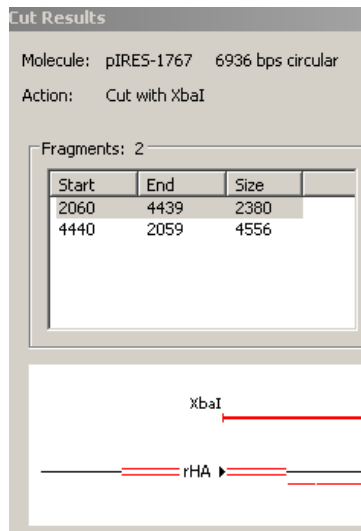
**Abb. 3.2.: Agaroselektrophorese des mit EcoRV und NheI linearisierten Plasmids**

Weiter wurde der Vektor durch eine Agarosegelelektrophorese von kleinen ausgeschnittenen Fragmenten gereinigt (vgl. Kap. 2.1.3). Dazu wurde die Vektorbande ausgeschnitten und mittels Gelextraktionskit aus dem Agarosegel isoliert (vgl. Kap. 2.1.4).

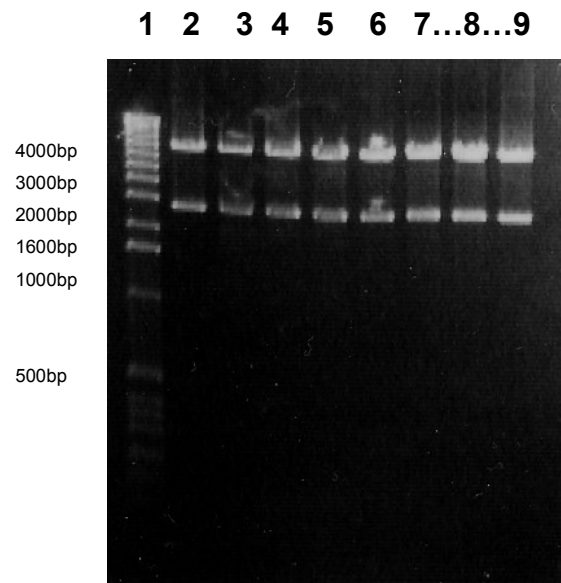
Der 5'-Überhang wurde mittels *Klenow* DNA Polymerase zu einem glatten Ende mit dNTPs aufgefüllt. (vgl. Kap. 2.1.6). Weiter wurde der Vektor mit dem *PCR purification kit* (vgl. Kap. 2.1.4) von Polymerasen und dNTPs gereinigt, ligiert, transformiert und anschließend auf eine LB-Agar Platte ausgespatelt. (vgl. Kap. 2.1.7, 2.1.8 und 2.1.9). Einige Klone auf der LB-Agar Platte mit Selektionsmedium wurden in 10 mL große Kultivierungsröhrchen mit je 4 mL Selektionsmedium überführt und ca. 16 Stunden fermentiert, um die Plasmid DNA zu vermehren.

Am Folgetag wurde die Plasmid DNA aus der Biomasse mithilfe des *Plasmid Miniprep Kits* isoliert, einem Kontrollschnitt mit den Restriktionsenzymen *XbaI* und *NheI* unterzogen und auf ein Agarosegel aufgetragen. Die Banden die nur ein einzelnes 6900 bp große Fragment und keine durch die Schnittstelle *NheI* verursachte kleinere

Fragmente aufzeigen, weisen auf eine erfolgreiche Eliminierung der Schnittstelle *NheI* hin.



**Abb. 3.3.: Schnittmuster einer erfolgreichen Klonierung von Plasmid 1767 mit XbaI**



**Abb. 3.4.: Agarosegelelektrophorese zur Überprüfung der erfolgten Eliminierung, der Restriktionschnittstelle *NheI* 1. Größenmarker, 2.-9. das Plasmid 1767 inkubiert mit NheI und XbaI, NheI hat nicht geschnitten.**

Der daraus hervorgegangene Klon erhielt die Nummer 1767 und diente als Ausgangsklon für die folgenden Albuminmutagenesen.

### 3.1.1.2 Mutagenesen von Albumin, Einbringung von Schnittstellen

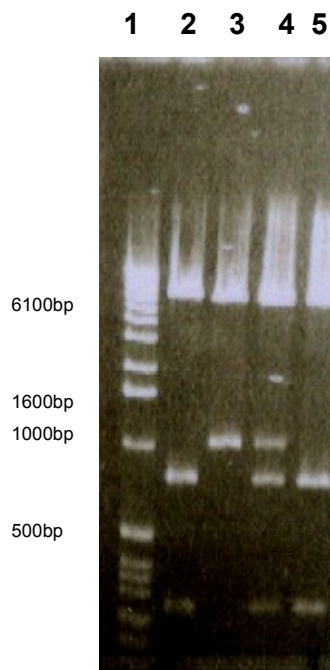
Zur Einbringung der Erkennungssequenz des Restriktionsenzym *NheI* wurde für jede der sechs zu mutierenden Sequenzen im Albumin eine Mutagenese mit den entsprechenden Oligonukleotiden im Ausgangsvektor 1767 durchgeführt.

Eine Übersicht zu den Mutagenesen ist in Tab.: 3.2 zusammengefasst. Die durch Mutagenesen entstandenen Sequenzen sind im Anhang aufgelistet (vgl. Kap. 7.4).

**Tab. 3.1: Übersicht zu den durchgeführten Mutagenesen, die DNA Sequenzen, die die in Spalte drei beschriebene Aminosäuresequenz kodieren wurden auf DNA Ebene gegen die Basenabfolge des Restriktionsenzym *NheI* ausgetauscht, die die beiden Aminosäuren AS kodieren.**

<b>Mutagenese Nr.</b>	<b>Mutagenese Oligonukleotide</b>	<b>durch <i>NheI</i> ersetzte AS</b>	<b>Klon Nr.</b>	<b>Sequenz nach der Mutagenese</b>
<b>I</b>	3222+3223	KHPEAK	1774	AAAAAS
<b>II</b>	3224+3225	KTPV	1775	AAAS
<b>III</b>	3226+3227	ETYVPKEFNAE	1776	AAAAAAAAAS
<b>IV</b>	3228+3229	KATKE	1777	AAAAS
<b>V</b>	3230+3231	KADDKET	1778	AAAAAAS
<b>VI</b>	3232+3233	KLVAASSQAA	1779	AAAAAAAAAAS

Die Mutagenesen wurden mit dem „*Stratagene Quick Change Site-Directed Mutagenese-Kit XL*“ durchgeführt, dem Mutagenese Ansatz wurde im Anschluss das Enzym *DpnI* zugegeben, um den methylierten Ausgangsvektor abzubauen (vgl. Kap. 2.1.1.2). Weiter wurde das Produkt der Mutagenese in *E. coli* Zellen transformiert (vgl. Kap. 2.1.8), Einzelklone selektioniert (vgl. Kap. 2.1.9) und die Plasmide durch Fermentation von *E. coli* vermehrt. Die Aufreinigung der Plasmide aus der Biomasse wurde mittels „Plasmid Miniprep Kit“ durchgeführt. Zur Kontrolle der erfolgreichen Mutagenese wurde ein Kontrollschnitt mit den Restriktionsenzymen *XbaI* und *NheI* durchgeführt und auf dem Agarosegel aufgetragen (vgl. Kap. 2.1.2 und 2.1.3). Abb 4.1 zeigt exemplarisch das Agarosegel von Plasmid 1774 geschnitten mit *NheI* und *XbaI*.



**Abb. 3.5: Agaroselektrophorese des Plasmids 1774 geschnitten mit *NheI* und *XbaI***

Auf Spur eins wurde 1kb Marker aufgetragen, auf den Spuren zwei bis fünf Plasmid 1774 aus verschiedenen Klonen mit *NheI* und *XbaI* geschnitten. Die Spuren zwei und fünf zeigen je drei Fragmente auf; demnach haben beide Restriktionsenzyme geschnitten und es handelt sich um positive Klone. Die Bande Spur drei zeigt nur zwei Fragmente, eines mit der Größe von 1000 bp und das ungeschnittene Plasmid, was einem Schnitt mit *XbaI* entspricht. Der Klon besitzt demnach keine Schnittstelle des Enzyms *NheI* und ist somit negativ. Die Spur vier zeigt einen unvollständigen Schnitt des Enzyms *NheI*, der Klon wurde verworfen.

Der Klon von Spur zwei wurde von der Fa. „MWG Eurofins“ sequenziert (vgl. Kap. 2.1.11), die dabei vorgefundene Sequenz enthielt die erwartungsgemäß die Restriktionsschnittstelle *NheI*. Die in Tab. 3.1 dargestellten Mutagenesen wurden analog zu der hier exemplarisch Beschriebenen durchgeführt.

Die Klone 1775-1779 mit Ihren Schnittstellen des Enzyms *NheI* an den zu alanisierenden Sequenzen sind die Ausgangsplasmide für die Einbringung der synthetisch hergestellten Oligonucleotide. Diese codieren die gleiche Anzahl an Alaninen, wie die Anzahl der entfernten Aminosäuren aus dem Wildtyp Albumin.



### 3.1.1.3 Die Einbringung der Alanin kodierenden Oligonukleotide

Zur Einbringung der Alanin kodierenden Oligonukleotide in die in Kap 3.1.1.2 hergestellten Plasmide mit den Nummern 1774-1779 wurden diese zunächst mit dem Restriktionsenzym *NheI* linearisiert. Weiter wurden die Restriktionsansätze durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt um die linearisierten von den nicht linearisierten Plasmiden zu trennen. Hierzu wurde linearisiertes Plasmid mit dem Gelextraktionskit (vgl. Kap. 2.1.4) isoliert.

Nachdem die Oligonukleotide fünf Minuten bei 95°C dehybridisiert worden sind, wurden diese mit ihrem jeweiligen linearisierten Plasmid (vgl. Tab. 3.2: Übersicht zu den durchgeführten Alanisierungen in einen Ligationsansatz (vgl. Kap. 2.1.7) gegeben.

Tab. 3.2: Übersicht zu den durchgeführten Alanisierungen

Mutagenese Nr.	verw. mutations Oligonukleotide	Durch Alanine ersetzte AS	Template Nr.	Neue Klon Nr.
I	3212+3213	KHPEAK	1774	1796
II	3214+3215	KTPV	1775	1797
III	3216+3217	ETYVPKEFNAE	1776	1798
IV	3218+3219	KATKE	1777	1799
V	3220+3221	KADDKET	1778	1800
VI	3222+3223	KLVAASSQAA	1779	1801

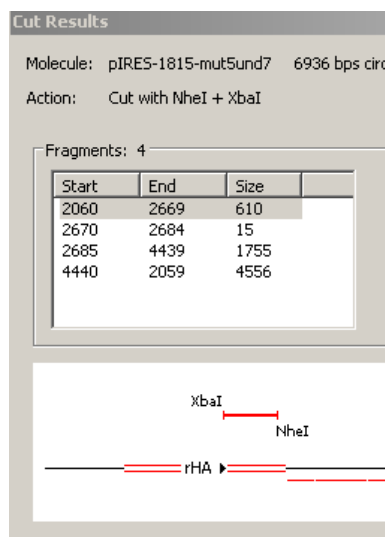
Weiter wurden die sechs neuen Konstrukte in *E. coli* Zellen transformiert (vgl. Kap. 2.1.8), Einzelklone selektioniert (vgl. Kap. 2.1.9) und die Plasmide durch Fermentation von *E. coli* im Kultivierungsröhrchen vermehrt. Die Aufreinigung der Plasmide aus der Biomasse wurde mittels „Plasmid Miniprep Kit“ durchgeführt. Zur Kontrolle wurde ein Kontrollschnitt mit den Restriktionsenzymen *XbaI* und *NheI* durchgeführt und auf dem Agarosegel aufgetragen, um zu prüfen, ob die jeweiligen *E. coli* Klone das Plasmid erhalten und vermehrt hatten. Zum Abschluss wurden die neuen Klone mit den Nummern 1796-1801 zur Sequenziert und abgelegt.

Nach Bestätigung positiver Klone von Seiten des Sequenzierlabor, wurden größere Mengen Plasmid im 250 mL Schüttelkolben im *E. coli* produziert, aufgereinigt und zur Transfektion in Zellkulturen bereitgestellt.

#### **3.1.1.4 Die Herstellung einer Punktmutation am Beispiel des Albuminklons 1815**

Zur Herstellung des Albuminklons 1815 diente der Klon 1800 (vgl. Tab. 3.2) als *Template*.

Von Seiten der Bioinformatik (vgl. Kap. 1.5.1.1) wurde empfohlen, zusätzlich zu der Alanisierung der sieben Aminosäuren „KADDKET“ das Threonin an Stelle 515 zu alanisieren. Dazu wurde eine Mutagenese mit den Oligonukleotiden 3301 und 3302 (vgl. Kap. 2.1.1.2) im Plasmid 1800 durchgeführt. Weiter wurde das neue Konstrukt in *E. coli* Zellen transformiert (vgl. Kap. 2.1.8), Einzelklone selektioniert (vgl. Kap. 2.1.9) und die Plasmide durch Fermentation von *E. coli* im Schüttelkolben vermehrt. Die Aufreinigung der Plasmide aus der Biomasse wurde mittels „Plasmid Miniprep Kit“ durchgeführt. Zur Kontrolle wurde ein Kontrollschnitt mit den Restriktionsenzymen *Xba*I und *Nhe*I durchgeführt und auf dem Agarosegel aufgetragen um zu prüfen, ob die jeweiligen *E. coli* Klone das Plasmid erhalten und vermehrt hatten.



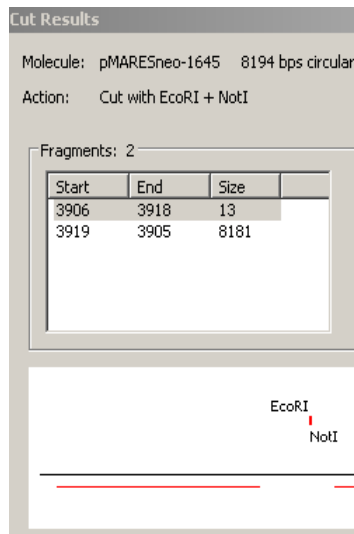
**Abb. 3.6. Ausschnitt aus der Genkarte von einem rekombinanten Humanalbuminklon 1815 geschnitten mit *NheI* und *XbaI***

Der Erfolg der Mutagenese wurde durch eine Sequenzierung bestätigt und der Vektor konnte zur Transfektion in Zellkulturen bereitgestellt werden.

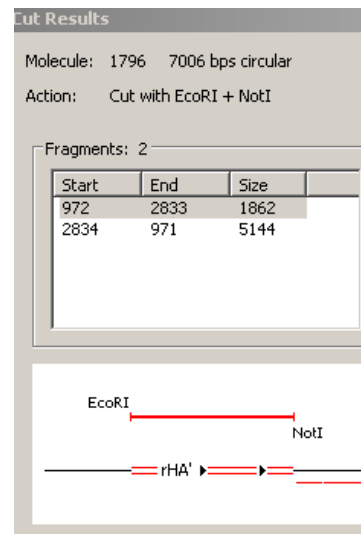
### 3.1.1.5 Das Umklonieren von Albuminen in andere Expressionssysteme

Bei einigen der in Tab. 3.2 zusammengefassten Konstrukten in *pIRES* Vektoren konnte in den dafür vorgesehenen HEK-293 Zellen keine oder nicht die zur Produktion in ausreichender Menge erforderliche Expressionsrate erreicht werden. Daher wurden solche Konstrukte in das *pMARES* Expressionssystem umkloniert, um eine Exprimierbarkeit in CHO Zellen zu testen und diese gegebenenfalls durch eine Einzelklonselektionierung zu steigern.

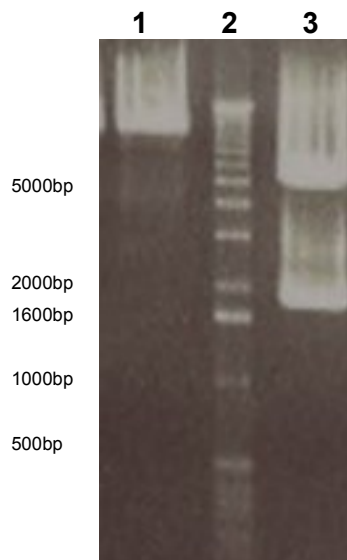
Dazu wurden die Albumine mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *NotI* aus dem Expressionsvektor *pIRES* geschnitten und mittels Agarosegelelektrophorese von ungeschnittenem Plasmid getrennt werden. Der Zielvektor *pMAREScneo-1645* wurde mit den gleichen Restriktionsenzymen linearisiert, hier gezeigt am Beispiel 1796.



**Abb. 3.7: Schnittmuster pMARES 1645 mit EcoRI und NotI**



**Abb. 3.8: Schnittmuster pIRES 1796 mit EcoRI und NotI**

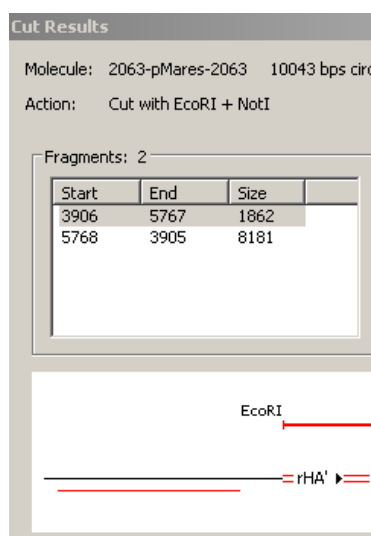


**Abb. 3.9.: Agarosegel zur Erläuterung der Umklonierung eines Gens, aufgetragen, 1. Vektor 1645 linearisiert mit EcoRI und NotI, 2. 1 kb Größenmarker, 3. Albumin Klon 1796 geschnitten mit EcoRI und Not I**

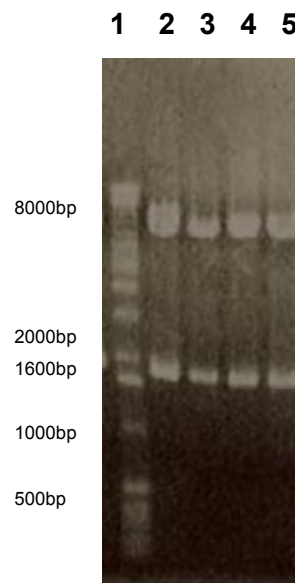
Das 1862 bp große Albuminfragment wurde wie auch der linearisierte Vektor aus dem Gel ausgeschnitten und mithilfe des Gelextraktionskits (vgl. Kap. 2.1.4) aufgereinigt. Weiter wurden die Fragmente mit dem Vektor ligiert, die neuen Konstrukte in *E. coli* Zellen transformiert, (vgl. Kap. 2.1.9) Einzelklone selektioniert (vgl. Kap. 2.1.9) und die

Plasmide durch Fermentation im *E. coli* vermehrt. Die Aufreinigung der Plasmide aus der Biomasse wurde mittels „Plasmid Miniprep Kit“ durchgeführt. Zur Kontrolle wurde ein Kontrollschnitt mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *NotI* durchgeführt und auf dem Agarosegel aufgetragen, um zu prüfen, ob die Plasmide das Insert aufgenommen hatten.

Die durch das Umklonieren entstandenen Klone wurden unter den Plasmidnummern 2063-2068 abgelegt und zur Transfektion bereitgestellt (vgl. Kap.7.4).



**Abb. 3.10: Schnittmuster pMARES 2063 mit EcoRI und NotI**



**Abb. 3.11: Agarosegel, aufgetragen 1. Größenmarker, 2.-5. richtige Klone des Vektors pMARES 2063**

### 3.1.2 Herstellung punktmutierter Albuminvarianten

Nach der Erstellung von Abbaukinetiken in Ratten (vgl. Kap. 3.4), der Erstellung von Bindungskinetiken an den FcRn Rezeptor durch SPR (vgl. Kap. 3.5) und Charakterisierung der Faltung durch CD-Spektroskopie (vgl. Kap. 3.6) der produzierten Albuminmutanten (vgl. Tab. 3.1) unterschieden sich zwei Klone von den anderen.

Die unterschiedlichen Eigenschaften dieser zwei Klone mit den Nummern 1798 und 1954, im Vergleich zu dem Albumin Wildtyp und den anderen Mutanten gaben Anlass zur Herstellung von Punktmutagenesen einzelner Aminosäuren in beiden vorher alaninisierten Aminosäuresequenzen. Dies diente einer genaueren Untersuchung deren Abbauverhaltens und der Bindungseigenschaften zum FcRn (vgl. Kap 3.1.2)

Dazu wurden fünf punktmutagenisierte Albumine durch Mutagenese PCRs (vgl. Kap. 2.1.1.2) hergestellt.

Als Ausgangsvektor diente das Plasmid 1645 (vgl. Kap. 7.4). Die dazu verwendeten Oligonukleotide und die Plasmidnummern der dabei entstandenen Klone sind in folgender Tabelle zur Übersicht dargestellt.

Tab. 3.3 Übersicht zu den Punktmutagenesen

Mutagenese Nr.	Mutagenese Primer	Mutagenisierte AS	Neue Klon Nr.
I	3368+3369	AATKE	1850
II	3673+3674	QATKE	2166
III	3675+3676	HATKE	2167
IV	3677+3678	KATKD	2168
V	3198+3199	ATYVPKEFNAA	1853

Im Anschluss an die Mutagenese wurden die neuen Konstrukte in *E. coli* Zellen transformiert (vgl. Kap.2.1.1.2 ), Einzelklone selektioniert (vgl. Kap.2.1.9) und die Plasmide durch Fermentation von im *E. coli* im Kulturröhrchen vermehrt. Die Aufreinigung der Plasmide aus der Biomasse wurde mittels „Plasmid Miniprep Kit“ durchgeführt (vgl. Kap. 2.1.10). Zur Kontrolle wurde ein Kontrollschnitt mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *NotI* durchgeführt und auf dem Agarosegel aufgetragen um zu prüfen, ob die jeweiligen *E. coli* Klone das Plasmid erhalten und vermehrt hatten. Zum Abschluss wurden die neuen Klone zur Sequenzierung gegeben. Nach Bestätigung positiver Klone von Seiten des Sequenzierlabors wurden über 100 µg des Plasmid im 250 mL Schüttelkolben im *E. coli* produziert, aufgereinigt und zur Transfektion in Zellkulturen bereitgestellt.

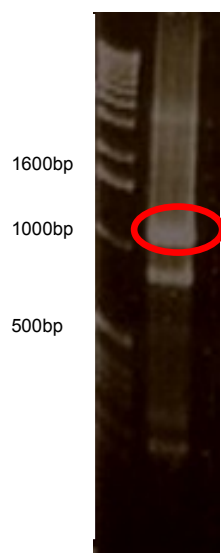
### 3.1.3 Klonierung des humanen neonatalen Fc-Rezeptors

Zur Bestimmung der Bindungseigenschaften zwischen dem FcRn und den Albuminmutanten wurde die cDNA des humanen FcRn und seiner Untereinheit, des  $\beta$ -2 Mikroglobulins, aus einer Leber cDNA Bank der Fa. Ambion isoliert und in einen Expressionsvektor kloniert.

#### 3.1.3.1 Isolierung der cDNA humanen FcRn und des $\beta$ -2 Mikroglobulins aus einer cDNA Bank

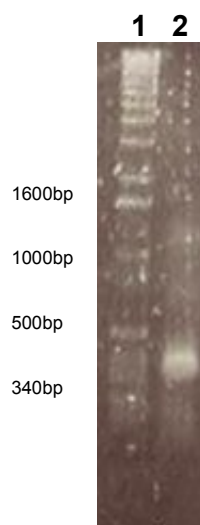
Zur Isolierung der beiden cDNA wurde die Strategie zweier aufeinanderfolgender Polymerasekettenreaktionen gewählt. Die Erste vom Typ *Touchdown* PCR (vgl. Kap. 2.1.1.1) wurde gewählt, um bei einer initialen hohen Temperatur die Spezifität der *Primer* zu erhöhen und dadurch eine unspezifische Amplifikation von anderen DNA Sequenzen gering zu halten.

Dennoch sind auf dem Gelfoto der *touchdown* PCR neben der aus der Literatur bekannten Größe von 1127 bp weitere amplifizierte DNA Fragmente zu sehen. Sind diese besonders stark amplifiziert, kann die Ursache eine weitere Form des gesuchten Zielproteins sein, die ein anderes *Postprocessing* während des *Splicing* Vorgangs durchlaufen hat. Die deutlich zu erkennende Bande unter der des FcRn mit ca. 800 bp ist sehr wahrscheinlich eine solche Form des FcRn, die bereits bekannt ist und beschrieben wurde. (Lilin Ye 2008)



**Abb. 3.12** Agarosegel, aufgetragen 1. Größenmarker,  
2. Amplifikat der *touchdown* PCR des humanen FcRn

Im Anschluß wurde mit einer Probe des dabei entstandenen PCR Produkts eine *nested* PCR (vgl. Kap. 2.1.1.1) durchgeführt, wodurch die Amplifikation des gesuchten Gens durch andere *Primer* noch einmal spezifiziert wurde, so dass das gesuchte Gen nach dieser zweiten PCR in einem starken Überschuss gegenüber unspezifisch amplifizierter DNA vorlag. Die  $\beta$ -2 Mikroglobulin cDNA wurde analog zu FcRn mittels einer *touchdown*- gefolgt von einer *nested*-PCR aus der cDNA Leberbank der Fa. Ambion isoliert. Nach der ersten *touchdown* PCR und nach der zweiten *nested* PCR wurden Proben des Amplifikats auf ein Agarosegel aufgetragen.



**Abb. 3.13** Agarosegel, aufgetragen links 1 kB Marker, rechts Amplifikat des  $\beta$ -2 Mikroglobulins aus der *touchdown* PCR



**Abb. 3.14** Agarosegel, aufgetragen 1. Größenmarker, 2. Das Amplifikat des  $\beta$ -2 Mikroglobulins aus der *nested* PCR

Das Agarosegel nach der ersten PCR (Abb. 3.13) zeigt noch einige schwache Banden die auf unspezifisch amplifizierte cDNA hinweisen. Auf dem Agarosegel nach der *nested* PCR dagegen sind keine unspezifisch amplifizierten DNA Fragmente mehr zu erkennen. Die 400 bp große cDNA des  $\beta$ -2 Mikroglobulins ist dagegen deutlich zu erkennen.



**Tab.: 3.1: Übersicht über die durchgeführten Polymerasekettenreaktionen zur Amplifikation des FcRn und des  $\beta$ -2 Mikroglobulins**

Isolierte cDNA	Klonnummer	Primer 1. PCR	Primer 2. PCR
<b>FcRn</b>	1808	3182 + 3183	3184 + 3185
<b><math>\beta</math>-2 Mikroglobulin</b>	1833	3315 + 3316	3317 + 3318

Die Amplifikate der jeweils zweiten PCR beider isolierter Gene wurden jeweils aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem Gelextraktionskit (vgl. Kap. 2.1.4) isoliert.

Die Fragmente wurden mit Hilfe des „TOPO TA cloning kits“ (vgl. Kap. 2.1.5) in einen pCR4 Vektor (s.h. Abb.7.5.3) kloniert.

Weiterhin wurden die neuen Konstrukte in *E. coli* Zellen transformiert (vgl. Kap. 2.1.8), Einzelklone selektioniert (vgl. Kap. 2.1.9) und die Plasmide durch Fermentation von *E. coli* im Kulturröhrchen vermehrt. Die Aufreinigung der Plasmide aus der Biomasse wurde mittels „Plasmid Miniprep Kit“ durchgeführt. Zur Kontrolle wurde ein Kontrollschnitt mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* durchgeführt und auf dem Agarosegel aufgetragen, um den Erhalt des Inderts zu überprüfen. Zum Abschluss wurden die neuen Klone mit den Nummern 1808 und 1833 zur Sequenzierung gegeben. Die Sequenzierprimer für im *pCR 4 TOPO Vektor* vorliegende DNAs heißen *M13* und *M13 rev* und sind Bestandteil des *TOPO TA cloning kits*.

### 3.1.3.2 Die Markierung des FcRn durch einen His-tag

Um die Aufreinigung des FcRn aus Zellkulturüberständen zu erleichtern, wurde diesem wie folgt ein His-tag angefügt: Das FcRn Gen wurde aus dem Plasmid 1808 (vgl. Kap. 3.1.3.1) durch eine PCR (vgl. Kap. 2.1.1) mit den Primern 3331 und 3312 (vgl. Kap. 3.1.3.1) amplifiziert. Die Primer wurden so gewählt, dass der Primer *upstream* vom 5' Ende des zu amplifizierenden Gens die Restriktionsschnittstelle des Enzyms *EcoRI* enthielt und seine codogene Sequenz *downstream* von der Transmembrandomäne bindet, dadurch wurde diese nicht mit amplifiziert. Der zweite Primer hatte eine codogene Sequenz am 3' Ende des zu amplifizierenden Gens, gefolgt von einer sechs Histidinen kodierenden Sequenz und einer Schnittstelle für *NotI*. Das Amplifikat dieser PCR bestand aus dem Gen des humanen FcRn ohne Transmembrandomäne, mit sechs Histidinen am C-terminalen Ende, flankiert von den Restriktionsschnittstellen der Enzyme *EcoRI* und *NotI*.

Das  $\beta$ -2 Mikroglobulin wurde ebenfalls durch eine PCR aus dem Plasmid 1833 (vgl. Kap. 3.1.3.1) isoliert. Dazu wurden die Primer 3333 und 3334 (vgl. Anhang Kap. 7.3) verwendet, die das gesamte Gen amplifizierten und es mit Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *NotI* flankierten.

### **3.1.3.3 Einbringung des neonatalen Fc-Rezeptors in Expressionsplasmide**

Die in Kap. 3.1.3.2 amplifizierten Fragmente wurden wie folgt in den Expressionsvektor 1645 kloniert: Die beiden Fragmente aus den Plasmiden 1808 und 1833 wurden wie auch der Vektor 1645 (s.h. Anhang. 7.5.2) mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *NotI* geschnitten. Der Vektor 1645 wurde dabei linearisiert und enthielt wie auch beide Fragmente dadurch an beiden Enden *sticky ends* in Form von 5' Überhängen. Diese beiden Fragmente wurden jeweils in einen linearisierten Vektor ligiert (vgl. Kap. 2.1.7). Die dabei entstandenen neuen Klone wurden sequenziert, unter den Plasmidnummern 1836 und 1837 abgelegt (s.h. Anhang 7.4) und zur Transfektion auf Zellkulturen bereitgestellt.

## 3.2 Zellkulturtechnische Arbeiten

### 3.2.1 Die Expression der Albuminklone

Sowohl die mutierten Albumine, als auch der Fc-Rezeptor und das  $\beta$ -2-Mikroglobulin wurden wie zuvor beschrieben in entsprechende Expressionsvektoren kloniert und in Zellkulturen exprimiert. Dabei wurden die Albuminmutanten kodierenden Plasmide zunächst in HEK-293 Zellen transfiziert. Manche Albuminmutanten konnten in HEK Zellen jedoch nicht oder nur schlecht exprimiert werden. Diese wurden daraufhin in einen Expressionsvektor für CHO Zellen umklont, in diese transfiziert und Einzelklone selektiert.

#### 3.2.1.1 Expression der Albuminvarianten in HEK

Als erster Ansatz wurden die in Tab. 3.4 dargestellten Albuminklone durch Lipofektion in HEK Zellen transfiziert, diese Albumine befanden sich im pIRES Expressionsvektor (vgl. Kap 7.5.1), der eine Resistenz gegen das Antibiotikum Puromycin enthält.

Tab. 3.4 Übersicht, Transfektanden und deren Expression

Transfektion Nr.	Klon Nr.	ursprüngl. Sequenz	Sequenz nach Mutagenese	Expression [ $\mu\text{g/mL}$ ]
I	1796	KHPEAK	AAAAAS	0,56
II	1797	KTPV	AAAS	2,56
III	1798	ETYVPKEFNAE	AAAAAAAAAAS	1,54
IV	1799	KATKE	AAAAS	< 0,001
V	1800	KADDKET	AAAAAAS	3,23
VI	1801	KLVAASSQAA	AAAAAAAAAAS	2,87
VII	1815	KADDKET + T515	AAAAAAS+ A515	1,79
VIII	1853	Glu 519+Glu 529	A519 +A529	3,7

Die Expression in HEK-293 Zellen wurde auf Grund deren kürzerer Generationszeit gewählt.

Bereits zwei Tage nach der Transfektion wurde auf die adhaerent wachsende Zellschicht ein Expressionsdruck von vier  $\mu\text{g/mL}$  Puromycin ausgeübt. Fünf Tage nach der Transfektion hatten die HEK-293 Zellen ihre Adhärenz verloren und schwammen gelöst im Medium; darunter waren mit dem Mikroskop noch keine lebenden Zellen von toten Zellen zu unterscheiden. Erst im Zeitraum zwischen 10 und 15 Tagen konnte man unter dem Mikroskop kleine Gruppen von lebenden und adhärierenden Zellen erkennen. Ab diesem Zeitpunkt wurde bei Transfektanden *Pools*, einer Gruppe gemeinsam transfizierter HEK-293 Zellen ein regelmäßiger partieller Medienwechsel vorgenommen, um tote Zellen auszutragen und die Lebenden vor Proteasen aus den toten Zellen zu schützen und mit neuen Nährstoffen zu versorgen.

Bereits nach ungefähr drei Wochen war der Boden des Transfektionsgefäßes mit adhärierenden Zellen bedeckt, eine Probe des Überstandes konnte entnommen und die Expression mittels Albumin ELISA (vgl. Kap. 2.4.3) bestimmt werden.

Die Transfektion von Albuminklonen in *pIRES* Vektoren auf HEK Zellen wurde stets in drei bis vier Ansätzen durchgeführt, um die Wahrscheinlichkeit auf einen stark exprimierenden HEK *pool* zu vergrößern. Weiter wurde der Transfektionsansatz nach einer Woche wiederholt, um mit Zellkulturen verschiedener Passagenzahl zu arbeiten. Es zeigte sich, dass der Zustand der Zellkultur der wichtigste Parameter zum Erfolg der Transfektion darstellt, gerade weil diese immer noch sehr viele Unbekannte enthält.

### 3.2.1.2 Expression der Albuminvarianten in CHO

Mit der Expression von Albuminen in CHO Zellen stand ein weiteres etabliertes Expressionssystem zur Verfügung, welches sich in der Expression von einigen Proteinen bezüglich ihres *Postprocessings* als potenter erwiesen hatte. Dazu bot sich die Möglichkeit der Einzelklonselektionierung durch Ausverdünnung der Transfektanden in 96 Well Platten auf Grund ihrer Eigenschaft als Suspensionszelle. Die durch diese Vorteile gegenüber der des HEK Expressionssystems deutlich an erhöhten Expressionsraten wurden durch einen erhöhten Aufwand an Zeit erkaufte. Eine Transfektion auf CHO Zellen mit anschließender Einzelklonselektion nahm sechs Wochen in Anspruch, eine Transfektion auf HEK *Pools* dagegen nur drei Wochen

Zur Transfektion von cDNAs zur Expression in CHO Zellen wurde der Expressionsvektor *pMARES* (vgl. Kap. 7.5.2) gewählt. Dieser unterscheidet sich im vom *pIRES* Vektor im Wesentlichen durch ein die Expression förderndes *MAR* Element und einem Resistenzgen gegen Genitacin anstatt Puromycin. Das Albumin Gen musste dazu von dem *pIRES* in den *pMARES* umkloniert werden (vgl. Kap. 3.1.3.3).

**Tab. 3.5 Übersicht über die in CHO transfizierten Albumine und deren Expression**

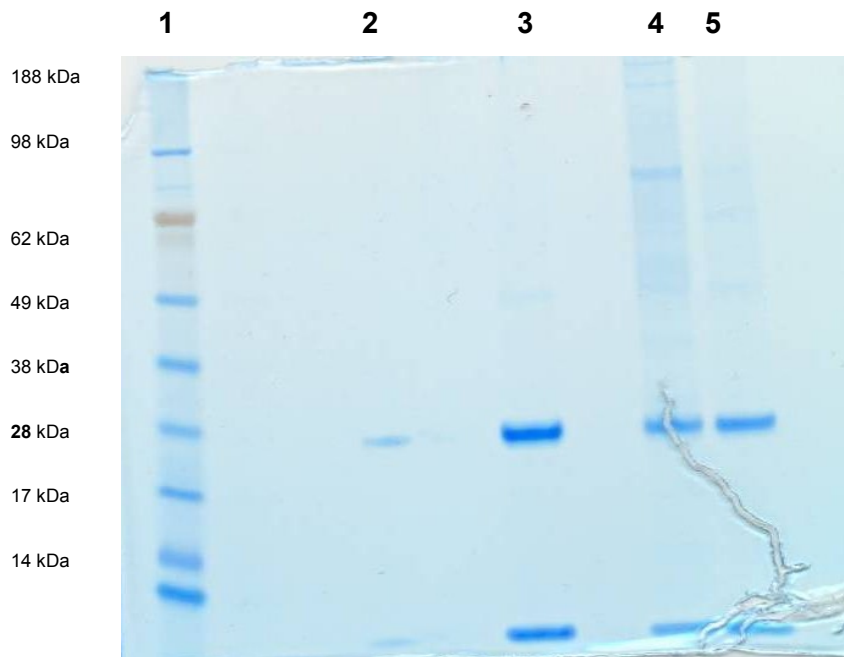
<b>Transfektion Nr.</b>	<b>Klon Nr.</b>	<b>Mutierte Sequenz</b>	<b>Sequenz nach Mutagenese</b>	<b>Expression in [µg/mL]</b>
<b>I</b>	2063	KHPEAK	AAAAAS	6,7
<b>II</b>	1954	KATKE	AAAAS	7,5
<b>III</b>	2129	KATKE	AATKE	6,6
<b>IV</b>	2166	KATKE	QATKE	8,3
<b>V</b>	2167	KATKE	HATKE	7,5
<b>VI</b>	2168	KATKE	KATKD	6,3

Die Transfektion von DNA in CHO Zellen wurde auf Grund höherer Klonausbeuten ausschließlich durch Elektroporation durchgeführt. Die Transfektandenpools wurden zwei Tage nach erfolgter Transfektion dem Selektionsdruck von Genitacin ausgesetzt und zu Einzelklonen in 96 *well* Platten ausverdünnt. Nach ca. sechs Wochen konnte man in etwa 20% der *wells* durch eine einfache Sichtkontrolle positive Klone ausmachen. Diesen wurde einhundert Mikroliter Überstand entnommen, was der Hälfte des Mediums entsprach und durch einen Albumin ELISA (vgl. Kap. 2.4.3) auf Expression getestet. Die dabei ermittelten Klone mit der höchsten Expressionsrate wurden in größeren Kultivierungsgefäßen weiter geführt. Außerdem wurden von diesen Rücklagen durch Kryokonservierung hergestellt und die entsprechenden Klone über einen *seedtrain* (vgl. Kap. 3.2.3) der Produktion zugeführt.

### **3.2.2 Expression des neonatalen Fc-Rezeptors in CHO**

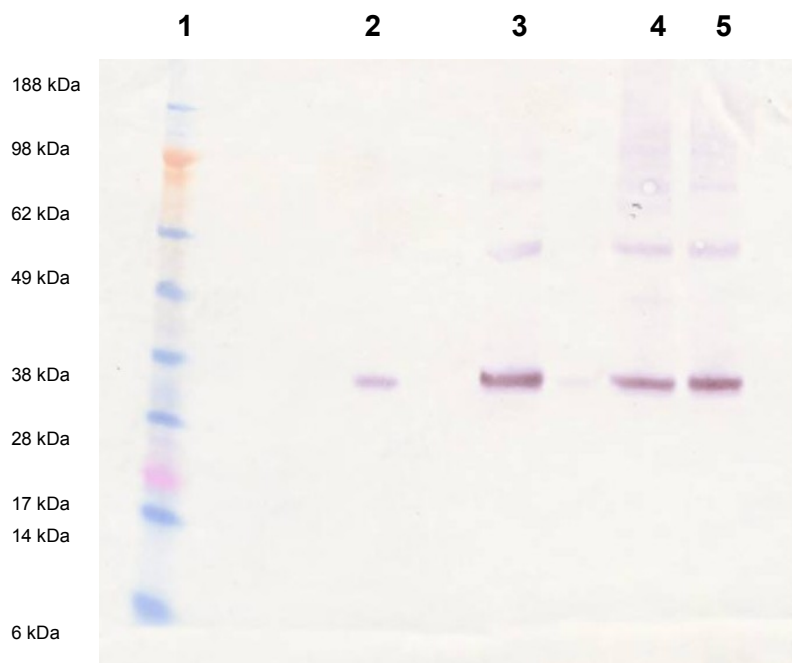
Der FcRn wurde auf Grund von Erfahrungen aus der Literatur (Gastinel L. N. 1992) ausschließlich in CHO Zellen exprimiert. Dabei wurde sowohl ein Plasmid welches den FcRn codiert, wie auch ein Plasmid welches dessen Untereinheit das  $\beta$ -2 Mikroglobulin

codiert im Überschuss transfiziert. Die Transfektion wurde mittels Elektroporation durchgeführt. Zur Selektion diente das Antibiotikum Genitacin. Im weiteren Vorgehen wurden Einzelklone selektioniert und in „12 well Platten“ auf einem Volumen von 3 mL kultiviert. Für den qualitativen Nachweis der Expression wurden Überstände ankonzentriert und Polyacrylamidgele und Westerblotts (vgl. Kap. 2.4.2) angefertigt (Abb. 3.15 und Abb.3.16).



**Abb. 3.15:**

zeigt eine SDS-PAGE mit ankonzentrierten Überständen von Kotransfektanden aus FcRn und  $\beta$ -2 Mikroglobulin. Es sind auf einigen Spuren zwei deutliche Banden von unterschiedlichen Stärken im Größenbereich des FcRn und des  $\beta$ -2 Mikroglobulins zu erkennen. Auf der Höhe der 62 kD Bande ist eine sehr dünne Bande nur mit Mühe zu erkennen, die auf dem Westernblot eines vergleichbaren Gels (s. h. Abb.3.16) deutlich wird.

**Abb.3.16:**

**Westernblot einer mit Abb. 3.15 vergleichbaren SDS-PAGE, detektiert mit einem Antikörper gegen Histidine, der mit alkalischer Phosphatase markiert war.**

Auf dem Westernblott wurde ein Antikörper gegen das his-tag des FcRn inkubiert. Durch einen zweiten mit Ap markierten Antikörper gegen diesen wurde das Substrat umgesetzt. Demnach sind nur Banden auf dem Blott entstanden, wo ein his-tag zugegen ist. Besonders deutlich sind die Banden auf Höhe des FcRn von 39 kDa zu erkennen und etwas schwächer auf Höhe der 62 kDa Bande darüber. Der FcRn wurde offensichtlich exprimiert wobei die Bande darüber um die Größe des  $\beta$ -2 Mikroglobulins größer ist als die des FcRn darunter. Folglich ist das  $\beta$ -2 Mikroglobulin auch bei den denaturierten Bedingungen der SDS-PAGE noch teilweise an den FcRn gebunden. Eine Zusammenführung des FcRn und des  $\beta$ -2 Mikroglobulins ist aber unter nativen Bedingungen möglich (West. A.P. 2000), eine Expression der beiden Proteine in diversen Expressionssystemen und deren anschließende Rückfaltung wurde bereits nachgewiesen (Andersen J. T. 2008).

### 3.2.3 Aufbau der Seedtrains

Als erster Produktionsschritt nach der Transfektion wurden sowohl die HEK Zellen, wie auch die CHO Transfektanten in Volumina von 20 bis 25 mL in T80 Flaschen kultiviert. Von diesem Kultivierungsvolumen ausgehend wurden von jedem Konstrukt

Kryokonserven angelegt, die als Basis für weitere Stabilitäts- und Expressionstests dienen.

Als zweiter Schritt wurde von einer Auftaukontrolle ausgehend, um einen Klon mit einer möglichst geringen Generationenzahl zu kultivieren, ein *seedtrain* angelegt. Dabei wurde in kleinen Verdünnungsschritten auf das nächst größere Verdünnungsgefäß ausverdünnt, der Selektionsdruck wurde erst bei der Vorkultur für den Fermenter abgesetzt. Die Vorkultivierung für den Fermenter fand bei den adhärent wachsenden HEK Zellen in der Rollerflasche statt und bei den in Suspension wachsenden CHO Zellen im Schüttelkolben.

Exemplarisch sind in Tab. 3.6 eine Auswahl der wichtigsten Expressionsparameter des Albuminklons 1954 dargestellt.

**Tab. 3.6 Kultivierungsparameter des *seed trains* von Klon 1954**

Tag nach Auftauen	Kult. gefäß	Vol. [mL]	pH	Glukose [g/L]	Zellzahl [ $\times 10^5$ Zellen]	Vitalität [%]	Produkt [ $\mu\text{g/mL}$ ]
1	T80	20	6,92	4,66	0,9	71	0,2
5	T175	50	6,81	4,56	1,4	86	
8	3x T175	3x 50	6,92	3,91	1,2	90	
13	SK	500	6,79	3,87	1,5	87	
17	2 SK	2x 500	6,98	3,76	2,7	82	0,4

Die Expression wurde im ELISA nur einmal nach Auftauen und einmal vor Animpfen des Fermenters im *seed train* gemessen.



### 3.2.4 Fermentation

Die Fermentation sämtlicher Albuminklone, wie auch die des FcRn fand je nach Verfügbarkeit der Geräte im zehn Liter Glasfermenter oder *Wave* Fermenter statt und wurde im Verfahren *repeated batch* durchgeführt.

Exemplarisch ist im Folgenden die Fermentation des Albuminklons 1954 im zehn Liter Glasfermenter im *repeated batch* Verfahren dargestellt. Der Fermenter mit einem Arbeitsvolumen von zehn Litern wurde zunächst mit vier Litern Zellkulturmedium befüllt und mit einem Liter Zellsuspension aus dem Schüttelkolben angeimpft. Nach zwei Tagen hatten die Zellen eine Phase exponentiellen Wachstums erreicht (s.h. Abb. 3.17), der Fermenter konnte auf zehn Liter aufgefüllt werden und hatte damit sein Arbeitsvolumen erreicht. Am sechsten Tag der Fermentation war die Glukose im Medium bis auf ein g/L verbraucht (s.h. Abb. 3.17). Hierdurch wurde eine Ernte von acht Litern des Fermenters nötig, wobei zwei Liter als Inokulum für den zweiten *batch* zurückgelassen wurden. Der Fermenter wurde erneut mit Zellkulturmedium auf zehn Liter aufgefüllt, nach neun Tagen erneut geerntet und befüllt und nach 13 Tagen fand eine finale Ernte statt. Sämtliche geernteten Überstände wurden durch Filter von den Zellen getrennt und in Erntesäcken bei -20°C eingefroren und dort bis zur Aufreinigung gelagert.

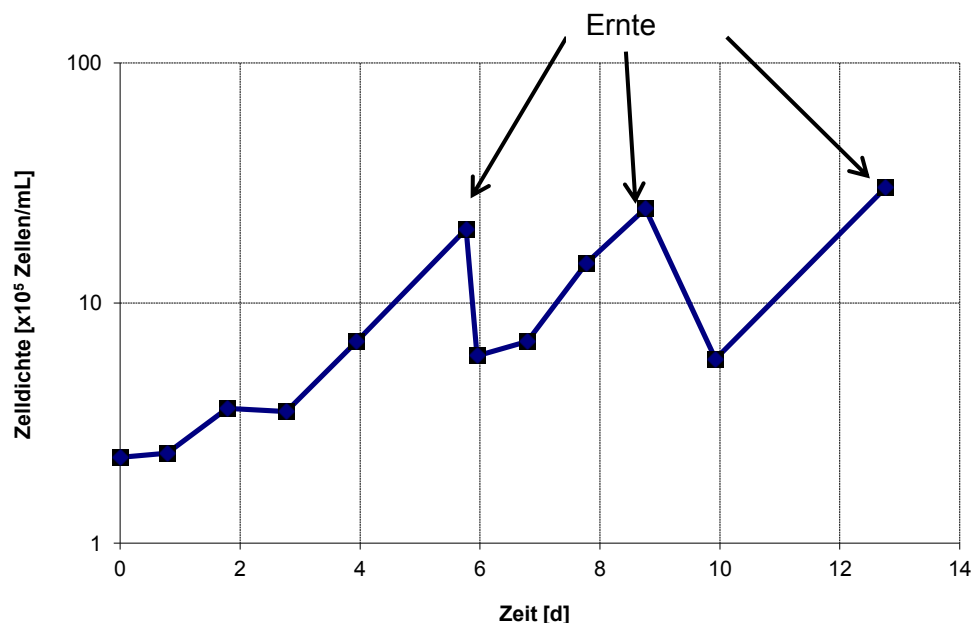


Abb. 3.17: Zelldichte der Fermentation von Albuminklon 1954. Die beiden Minima zeigen die Zeitpunkte nach den Ernten der an Tag sechs und neun auf.

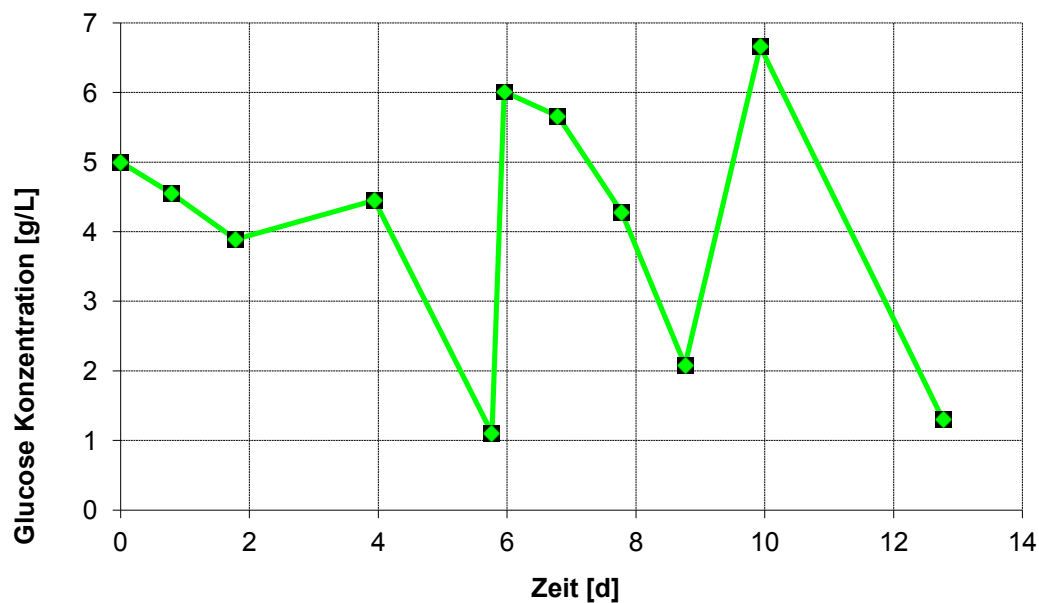


Abb. 3.18:

Verlauf der Glucose Konzentration der Fermentation von Albumin Klon 1954,

Im Fermenter ist häufig Glukose der wachstumsbeschränkende Parameter, beim *repeated batch* Verfahren wurde deshalb auch hier anhand der Glukose Konzentration im Medium am Tag drei Medium bis zum Arbeitsvolumen von zehn Litern aufgefüllt und an den Tagen sechs, neun und dreizehn der Fermentation geerntet.

Tab. 3.7: Ausbeuten der Ernten, der Fermentation von Klon 1954

batch Nr.	Erntevolumen [mL]	Produkt konz. [µg/mL]	Masse des Produkts [mg]
1	8000	0,18	1,44
2	9000	0,09	0,9
3	10000	0,07	0,7
Summe	27000		3,04

In diesem Fermenterlauf wurden drei *batches* mit einem Gesamtvolumen von 27 Litern Überstand produziert, die eine 3,04 mg Albumin des Klons 1954 enthielten (vgl. Tab. 3.7).

Eine weitere Bilanzierung dieser exemplarisch dargestellten Fermentation ist im Anhang abgebildet (s.h. Kap 7.7.1)

Es wurden in diesem Verfahren elf weitere Albumine sowie der humane FcRn produziert, eine Übersicht ist in Tab. 3.8 dargestellt.

**Tab. 3.8 Übersicht fermentierte Proteine und deren Mengen**

Klon Nr.	Vol. Überstände [mL]	Masse an Protein [mg]
<b>1796</b>	27000	14,4
<b>1797</b>	18000	8,5
<b>1798</b>	18000	14,6
<b>1800</b>	27000	5,3
<b>1801</b>	27000	4,7
<b>1815</b>	25000	11,2
<b>1853</b>	18000	15,1
<b>2063</b>	18000	18,5
<b>1954</b>	27000	3,0
<b>2129</b>	25000	7,4
<b>2166</b>	25000	13,3
<b>2167</b>	25000	15,6
<b>2168</b>	25000	12,6
<b>FcRn</b>	5000	kein ELISA vorh.

Aus Tab. 3.8 ist zu entnehmen, dass die Expressionsraten der Albumine sich stark unterscheiden. Wenn man die produzierten Massen der Albumine mit den Expressionsraten nach der Transfektion (vgl. Tab. 3.4) vergleicht, ist keine Relation zu erkennen. Die Klone der einzelnen Albuminvarianten exprimieren unterschiedlich stark zu verschiedenen Zeitpunkten der Produktion. Aus diesem Grund wurden vor der Inokulation der Fermenter Proben mittels ELISA vermessen und deren Albumingehalt bestimmt. Anhand der Ergebnisse wurden entweder zwei *batches* (18L) oder drei *batches* (27L) produziert; einige der Albumine wurden im *wave* Fermenter produziert. In diesem System konnte ein Kultivierungssack im *fed batch* Verfahren bis auf 25 Liter aufgefüllt und anschließend geerntet werden.

Weil für den FcRn kein ELISA zur Verfügung stand, wurde anhand eines Western Blotts von Überständen (s.h. Abb.3.16) nach der Transfektion eine erforderliche Produktionsmenge von fünf Litern Überstand abgeschätzt.

### **3.3 Aufreinigung von Albumin und FcRn**

Die Aufreinigung der Albuminvarianten aus den Zellkulturüberständen erfolgte über eine Diafiltration zur Ankonzentrierung des Albumins im Überstand, gefolgt von einer Antikörper Affinitätschromatographie und einer anschließenden Ankonzentrierung des Eluats durch Zentrifugenfilter.

Der FcRn wurde über eine Ni-NTA Affinitätschromatographie gereinigt und anschließend mittels Zentrifugenfilter ankonzentriert.

Zur qualitativen Analytik wurden Polyacrylamidgele und Western Blots angefertigt. Zur quantitativen Analytik stand für Albumin ein ELISA zur Verfügung.

#### **3.3.1 Aufreinigung von Albumin**

Die Aufreinigung der Albumine wird in den folgenden Kapiteln 3.3.1.1 bis 3.3.1.3 exemplarisch am Klon 1954 demonstriert.

##### **3.3.1.1 Ankonzentrierung von Überständen mittels Diafiltration**

Nach dem Auftauen der Überstände im Wasserbad bei 37°C wurden diese bei einem *cutoff* von 0,22 µm sterilfiltriert und von Kryoaggregaten befreit. Anschließend erfolgte eine Ankonzentrierung der Überstände mit einem Volumen von 18 bis 27 Litern auf ein Volumen von 1 Liter bis 2 Litern mittels Diafiltration. Die Diafiltrationsmembran hatte einen *cutoff* von 30 kDa. Trotz des ausreichenden Größenunterschieds zur molaren Masse von 66 kDa des Albumins wurden die Permeate im ELISA untersucht. Es konnte bei keinem der diafiltrierten Albumine ins Permeat durchgedrungenes Produkt gefunden werden.

Dennoch lagen die Verluste beim Albuminklon 1954 bei 11,6 %, vermutlich verursacht durch unspezifische Bindungen an die Filtermembran.

Tab. 3.9 Bilanzierung der Diafiltration von Überstand 1954

Probe	Vol. [mL]	Konz. [ $\mu\text{g/mL}$ ]	Masse [ $\mu\text{g}$ ]
Überstand	27000	0,112	3040
Permeat	26000	0	< 20 ng
Retentat	900	2,98	2685

### 3.3.1.2 Affinitätschromatographie von Albuminvariante 1954

Die Aufreinigung der Albumine aus den ankonzentrierten Überständen erfolgte durch eine Affinitätschromatographie; als Ligand diente dazu ein an die Säulenmatrix gebundener monoklonaler anti-Albumin-Antikörper (vgl. Kap. 2.3.3).

Die verwendete Chromatographiesäule hatte ein Säulenvolumen von zehn mL Säulenmatrix; die vorgegebene Inkubationszeit von ca. zehn min erforderte eine Fließgeschwindigkeit von nur einem mL/min.

Das auf ca. einen Liter ankonzentrierte Retentat aus der zuvor getätigten Diafiltration (vgl. Kap. 3.3.1.1), wurde über den Zeitraum von 15 Stunden aufgetragen und dabei auf Eis gelagert. Nach dem Auftragen wurde die Säule mit Äquilibrationpuffer gespült, bis das UV Signal wieder auf null mAU gefallen war (s.h. Abb. 3.19).

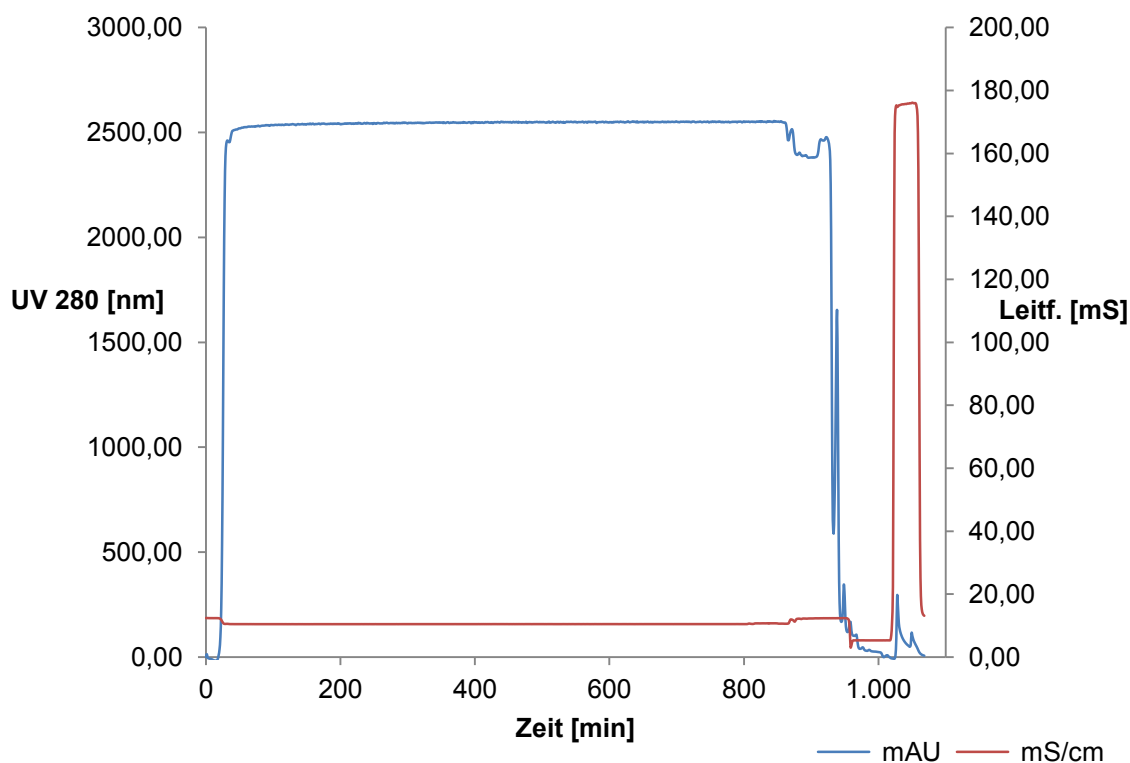


Abb. 3.19:

Chromatogramm der Affinitätschromatographie des Albuminklons 1954, dargestellt sind die Leitfähigkeit und das UV-Signal über die der CHromatographie.

Die Elution erfolgte durch einen sauren und salzhaltigeren Elutionspuffer; dabei stieg das Leitfähigkeitssignal auf über 170 mS/cm und das Leitfähigkeitssignal zeigte einen großen und einen kleineren Elutionspeak an.

Das Elutionsvolumen betrug 16 [mL] und hatte eine Albuminkonzentration von 117 [ $\mu\text{g/mL}$ ], was einer Gesamtmasse von 1,88 [mg] entspricht. Der Verlust beträgt dabei in diesem Aufreinigungsschritt 29 %, wovon 24 % im Durchlauf nachgewiesen werden konnten (s.h. Tab. 3.10).

Tab. 3.10 Übersicht, Bilanz der Affinitätschromatographie von Klon 1954

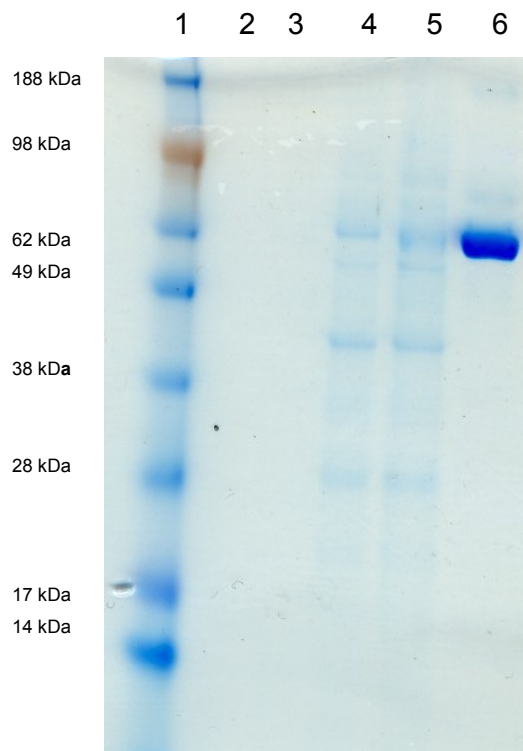
Probe	Vol. [mL]	Konz. [ $\mu\text{g/mL}$ ]	Masse [ $\mu\text{g}$ ]
Retentat / Auftrag	900	2,98	2685
Durchlauf	900	0,72	653
Eluat	16	117,9	1886,4
Konzentrat	2	861,5	1723,7

Nach der chromatographischen Aufreinigung erfolgte eine Konzentrierung des Eluats mittels Zentrifugenfiltern. Dabei wurde das Eluat im Zentrifugenfilter fünf bis zehn Minuten bei 3500 g zentrifugiert und dabei in physiologische Kochsalzlösung umgepuffert. Das Volumen des Konzentrats lag bei zwei mL, anschließend wurde dieses in einhundert  $\mu$ L große Fraktionen aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Im letzten Aufreinigungsschritt der Konzentrierung, gingen vom Eluat 8,6 % verloren.

In diesem finalen Schritt der Aufreinigung, der Albuminvariante 1954 wurden 27 L Kulturüberstand zu zwei [mL] Albuminkonzentrat aufgereinigt. Die Ausbeute von drei [mg] Albumin im Kulturüberstand ausgehend bis zu den gereinigten 1,72 mg Produkt betrug 56 %.

#### **3.3.1.3 Reinigungsanalytik von Albuminklon 1954**

Zur Bestimmung der Reinheit wurden sämtliche produzierten Albumine wie auch die hier gezeigte Variante 1954 mittels SDS PAGE analysiert (s.h. Abb. 3.20) und alle bei den Aufreinigungen auftretenden Fraktionen wurden im Albumin ELISA gemessen (s.h. Tab. 3.9 und Tab. 3.10).



**Abb. 3.20: SDS-PAGE der Fraktionen von Albuminklon 1954, 1. Größenstandard, 2. Überstand, 3. Permeat, 4. Retentat/Auftrag, 5. Durchlauf und 6. Eluat**

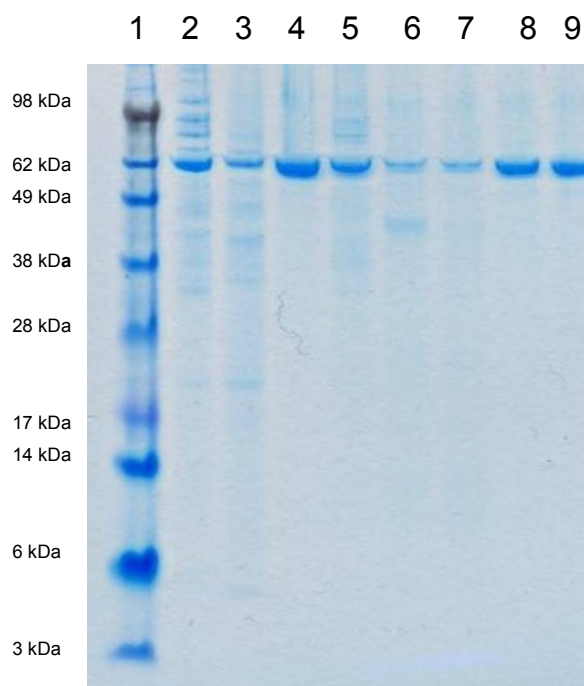
Aus dem in Abb. 3.20 dargestellten SDS-PAGE Gel zeigt eine erfolgreiche Reinigung von Albumin aus einem Zellkulturüberstand. Auf den Spuren zwei und drei sind Überstand und Permeat aufgetragen; auf Grund der großen Verdünnung der Proteine im Zellkulturüberstand sind keine Banden zu sehen. Auf den Spuren vier und fünf sind im Retentat bzw. Auftrag und Durchlauf Banden verschiedener Größe zu erkennen. In der sechsten Spur ist über der Bande in Höhe des 62 kDa Markers nur noch eine Bande zu erkennen. Die noch im Auftrag zu erkennenden Banden sind demnach Fremdproteine, die nicht an die Säulenmatrix gebunden haben und sind nahezu komplett im Durchlauf wieder zu finden.



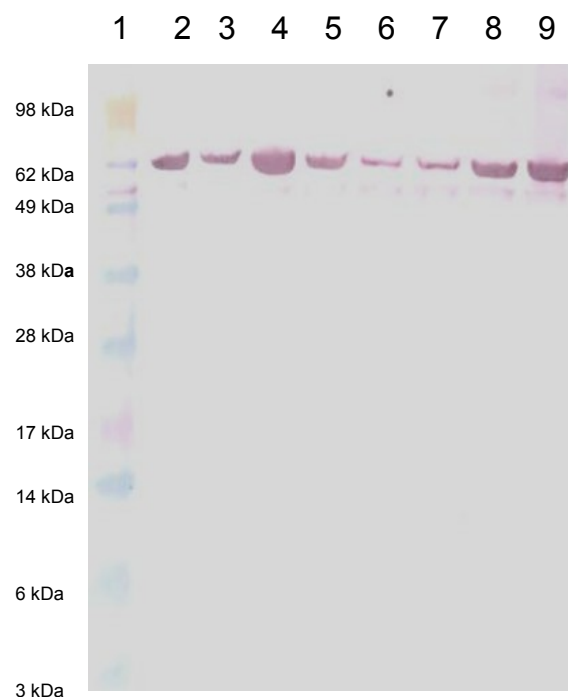
### 3.3.1.4 Überprüfung auf Fragmente im Western Blot

Zur Überprüfung der hergestellten Albuminvarianten auf Verunreinigungen und Fragmente wurden diese im Western Blot untersucht.

Alle Spuren des SDS-PAGE Gels wie auch die des Western Blots zeigen auf Höhe der Referenzbande des BSA im Marker eine deutliche Bande. Im SDS-PAGE Gel sind besonders auf den Spuren zwei und drei des HSA und des rHA-wt einige schwache Banden als Verunreinigung zu erkennen, jedoch handelt es sich dabei nicht um Albuminfragmente, wie der Blot (s.h. Abb. 3.22) belegt. Der Blott wurde mit einem polyklonalen Antikörper durchgeführt, der an mehrere Epitope am Albumin bindet. Wie aus Abb. 3.22 zu entnehmen ist, besitzen diese im Gel auf Abb. 3.21 zu erkennenden Fragmente keine dieser Epitope, somit ist die Wahrscheinlichkeit, dass es sich dabei um Albumin handelt, sehr gering.



**Abb. 3.21: SDS-PAGE von Albumin Eluaten, 1. Größenmarker 2.-9. Eluate der Albumine HSA, rHA-wt, 1797, 1797, 1798, 1800, 1801, 1815**



**Abb. 3.22: Western Blott des Gels aus Abb. 3.21, mit einem polyklonalen Anti Albumin Ak markiert und detektiert mit anti *rabbit IgG*- AP konjugiert**

### 3.3.1.5 Die aufgereinigten Albumine in der Übersicht

Die insgesamt 13 exprimierten Albumine wurden nach den am Bsp. des Albuminklons 1954 in Kap. 3.3.1.1 bis Kap. 3.3.1.4 beschriebenen Verfahren aufgereinigt und analysiert.

Die Ausbeuten aus diesen Aufreinigungen schwankten zwischen 32% und 74%. Diese starken Schwankungen lassen sich zum einen durch den langen Zeitraum von über zwei Jahren erklären, in dem die Aufreinigungen getätigt wurden und den damit verbundenen unterschiedlichen Materialien. Zum Anderen haben die unterschiedlichen Sorten Zellkulturmedium, je nach Zelltyp und die daraus angefallenen Abprodukte einen besonders großen Einfluss auf die Ausbeuten, darüber hinaus ist noch die Tatsache zu beachten, dass es sich bei jedem Albuminklon um ein anderes Protein handelt, dass selbst bei relativ kleinen Mutationen schon andere Eigenschaften aufweisen kann.

Tab. 3.11 Übersicht über die aufgereinigten Albumine und deren Ausbeuten

Klon Nr.	Masse Albumin im Überstand [mg]	Masse Albumin im Eluat [mg]	Ausbeute in [%]
1796	14,4	8,7	60
1797	8,5	5,5	65
1798	14,6	10,3	71
1800	5,3	2,4	45
1801	4,7	1,8	38
1815	11,2	7,8	70
1853	15,1	8,8	58
2063	18,5	11,4	62
1954	3,0	1,7	57
2129	7,4	5,5	74
2166	13,3	4,2	32
2167	15,6	6,6	42
2168	12,6	8,8	70

### 3.3.2 Aufreinigung des neonatalen Fc-Rezeptors

Der neonate Fc Rezeptor wurde mit einem hexameren *his-tag* markiert (vgl. Kap. 3.1.3.2), um diesen mittels Affinitätschromatographie über einen Nickel Liganden aufzureinigen. Das dazu verwendete Material *Ni Sepharose™ 6 FF* bot die Vorteile einer hohen Spezifität der Bindung an das Zielprotein kombiniert mit einer hohen Flussrate von 600 cm/h. Diese für eine Affinitätschromatographie hohe Flussrate entsprach bezogen auf den verwendeten Säulendurchmesser von 16 mm einer Flussrate von bis zu 20 mL/min, wodurch eine vorherige Ankonzentrierung des Zellkulturüberstandes und damit verbundene Ausbeuteverluste vermieden werden konnten.

#### 3.3.2.1 His-tag Affinitätschromatographie von Zellkulturüberstand einer FcRn Produktion

Der Zellkulturüberstand wurde in mehreren Erntesäcken eingefroren, um ein partielles Aufreinigen von mehreren *batches* nacheinander durchzuführen zu können.

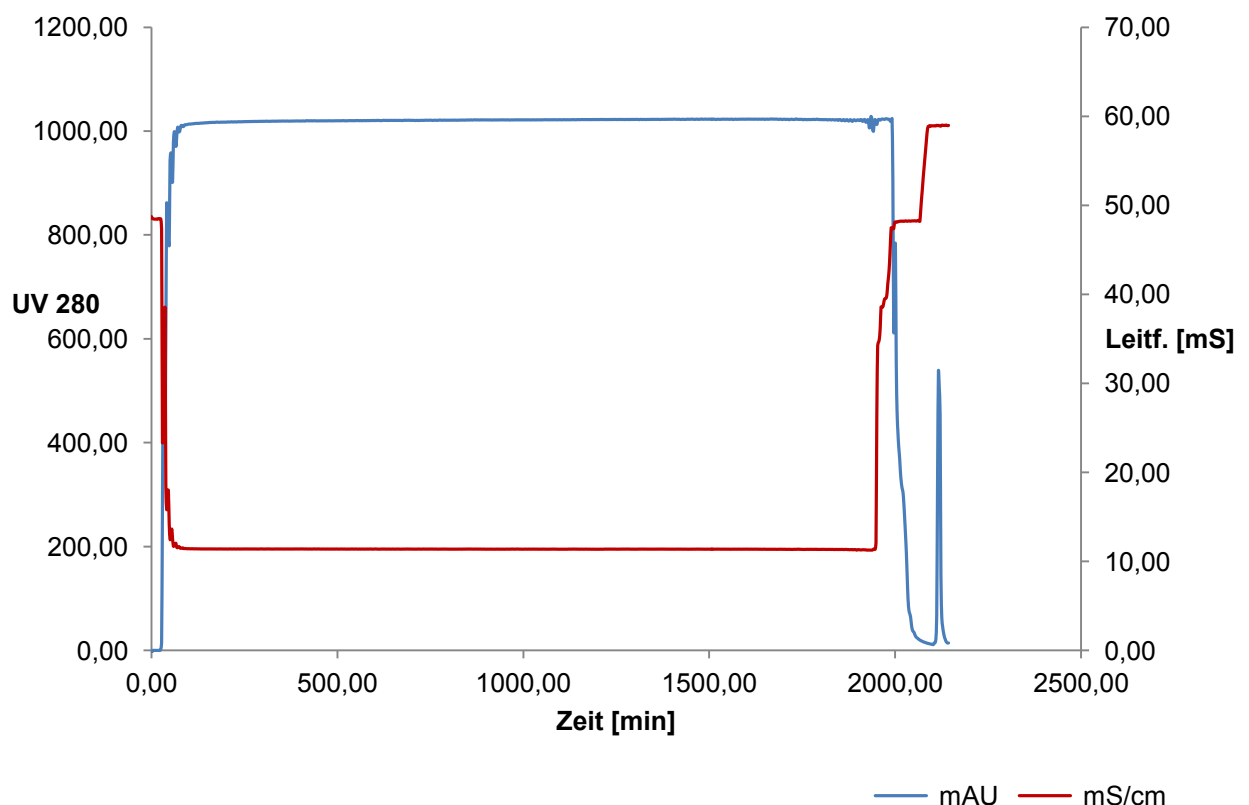


Abb. 3.23

Chromatogramm der Affinitätschromatographie von FcRn über reinen Nickel-NTA Liganden.

In Abb. 3.23 ist der Graph einer Aufreinigung von zwei Litern Zellkulturüberstand abgebildet, bei welcher der Überstand mit einer Flussrate von zehn mL/min aufgetragen wurde. Anschließend erfolgte ein erster Waschschrift, bei diesem unspezifisch an die Säulenmatrix gebundene Proteine und solche die eine zufällige Abfolge von Histidinen in ihrer Aminosäuresequenz enthielten, ausgewaschen wurden. Dazu wurde ein Puffer mit einer Konzentration von 20 mM Imidazol zur Elution verwendet. Der Waschschrift ist in Abb. 3.23 unter einem Anstieg des Leitfähigkeitssignals zu erkennen; ein *Peak* ist bei dieser kleinen Fraktion von nur vier mL nicht aus dem Chromatogramm zu entnehmen, was vermutlich an der Nähe des *peaks* zur abfallenden Auftragskurve und des geringen Volumens liegt.

Die Elution des Zielproteins FcRn mit *his-tag* erfolgte durch einen Puffer mit einem Imidazolgehalt von einhundert mM und ist an einem erneuten Anstieg des Leitfähigkeitssignals, sowie eines *peaks* im UV-Signal zu erkennen. Das Elutionsvolumen betrug zwölf mL.

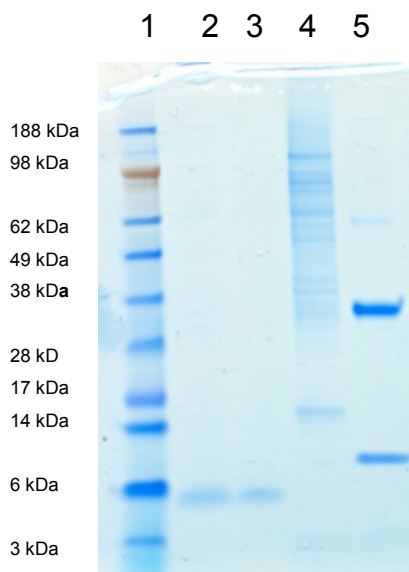
### 3.3.2.2 Reinigungsanalytik des FcRn

Die qualitative Analytik der Aufreinigung des FcRn wurde mithilfe eines SDS-PAGE Gels und eines Blotts (s.h.

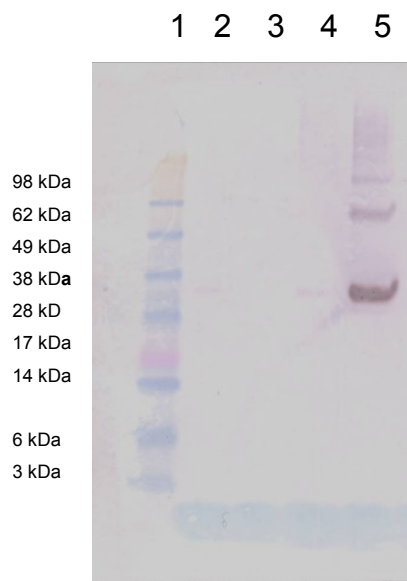
Abb. 3.24 und Abb. 3.25) durchgeführt. Dabei konnte im Überstand noch kein Zielprotein identifiziert werden. Lediglich eine Bande in Höhe von 7 kDa ist zu erkennen; die in der Spur des Durchlaufs erneut zu sehen ist. Ein Protein in der Größe des Zielproteins von 39 kDa ist auch im Durchlauf nicht erkennbar. Auf der Spur des Waschschrifts sind zahlreiche sehr schwache Banden unterschiedlicher Größen zu erkennen, eine deutliche Bande in der Höhe des Zielproteins jedoch nicht. Auf der Spur des Eluats sind drei Banden zu erkennen: Eine sehr starke auf der Höhe von 39 kDa, wobei es sich um den FcRn handelt, wie der Western Blot belegt (vgl. Abb. 3.25). Auf der Höhe von 13 kDa ist eine etwas schwächere Bande zu erkennen, die man im Blot nicht sieht, wobei es sich um das  $\beta$ -2 Mikroglobulin handelt. Das  $\beta$ -2 Mikroglobulin ist nicht mit Histidinen markiert und muss demnach während der Aufreinigung an den FcRn gebunden gewesen sein und wurde durch die denaturierenden Bedingungen des SDS-PAGE Gels vom FcRn abgelöst. Die Tatsache, dass FcRn und  $\beta$ -2 Mikroglobulin unter denaturierenden Bedingungen nicht aneinander Binden, sich aber unter nativen Bedingungen wieder finden und einen aktiven FcRn,  $\beta$ -2 Mikroglobulin Komplex bilden,

ist in der Literatur beschrieben (West. A.P. 2000) und wurde auch für diesen FcRn Komplex durch SPR spektroskopische Bindungstests an IgG und HSA bewiesen (vgl. Kap. 3.5.3)

Die dritte auf der Spur des Eluats zu erkennende Bande ist schwach, befindet sich auf der Höhe von 62 kDa und ist ebenfalls im Western Blot deutlich zu erkennen. Bei dieser Bande handelt sich um Reste eines noch intakten Komplexes aus FcRn und  $\beta$ 2-Mikroglobulin.



**Abb. 3.24:** SDS-PAGE Gel zur Aufreinigung von FcRn, aufgetragen 1. Größenmarker, 2. Auftrag, 3. Durchlauf, 4. Waschschrift, 5. Eluat



**Abb. 3.25:** Western Blott eines vergleichbaren Gels aus

Abb. 3.24 mit einem anti-Histidin AK, HRP markiert

### 3.3.2.3 Ankonzentrierung der Eluate im Zentrifugenfilter

Nach der chromatographischen Aufreinigung erfolgte eine Konzentrierung des Eluats mittels Zentrifugenfiltern. Dabei wurde das Eluat im Zentrifugenfilter fünf Minuten bei 3500 g zentrifugiert und dabei in physiologische Kochsalzlösung umgepuffert. Das Volumen des Konzentrats lag bei 2,1 mL, anschließend wurden diese in einhundert  $\mu$ L große Fraktionen aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.3.2.4 Bestimmung der hergestellten Masse an FcRn

Die quantitative Analytik des FcRn erfolgte photometrisch, dabei wurde eine Probe des Eluats gegen den Probenpuffer gemessen.

Tab. 3.12: photometrische Analyse der Aufreinigung von Eluat und Konzentrat FcRn

Probe	Volumen [mL]	Proteinkonzentration [mg]
FcRn Eluat	12	8,34
FcRn Konzentrat	2,1	1,29

Im Schritt der Konzentrierung gingen vom Eluat 11,6% verloren. Bei der photometrischen Messung ist zu beachten, dass hierbei nicht spezifisch das Zielprotein bestimmt wurde sondern alle Stoffe, die Licht der Wellenlänge 280 nm absorbieren, was aber auf Grund der im SDS-PAGE (Abb. 3.24) beobachteten sehr hohen Reinheit zu vertreten ist.

### **3.4 Pharmakokinetiken in der Ratte**

Um ein halbwertszeitverlängertes Albumin zu entwickeln, sollten zunächst die potentiellen Bindestellen am Albumin zu dem FcRn auf einige wenige Aminosäuren eingegrenzt und die Bindung gegebenenfalls verstärkt werden. Davon ausgehend, dass die Bindung von Albumin zum FcRn mit der Halbwertszeit von Albumin im Tier korreliert (Chaudhury C 2003), wurden zunächst Albuminvarianten hergestellt, in deren dritter Domäne, Aminosäuresequenzen mit einer Länge von fünf bis elf Aminosäuren durch Alanine ersetzt worden sind. Sollte eine dieser Mutanten eine deutlich verkürzte Halbwertszeit gegenüber dem Albumin Wildtyp aufweisen, wäre dies ein starkes Indiz für eine Bindestelle zu dem FcRn. Im Umkehrschluss sollten die Aminosäuresequenzen in Albuminvarianten, in denen Abfolgen von mehr als fünf AS durch Alanine ersetzbar sind und kein unterschiedliches Abbauverhalten verglichen mit dem Wildtyp Albumin im Tier zeigen, diese Albuminvarianten sollten als potentielle Bindestelle zum FcRn ausgeschlossen werden können. Um von diesen acht Albuminvarianten möglichst viele für eine Bindung an den FcRn auszuschließen wurden die verschiedenen Albuminmutanten Ratten appliziert und eine Abbaukinetik erstellt.

#### **3.4.1 Abbaukinetik alanisierter Albumine in der Ratte**

Die Abbaukinetik der alaninisierten Albumine in der Ratte lassen in halblogarithmischer Auftragung der Konzentration in Prozenten bezogen auf applizierten Dosen gegen die Zeitpunkte der Probennahme Schlüsse auf die Art des Abbaus zu.

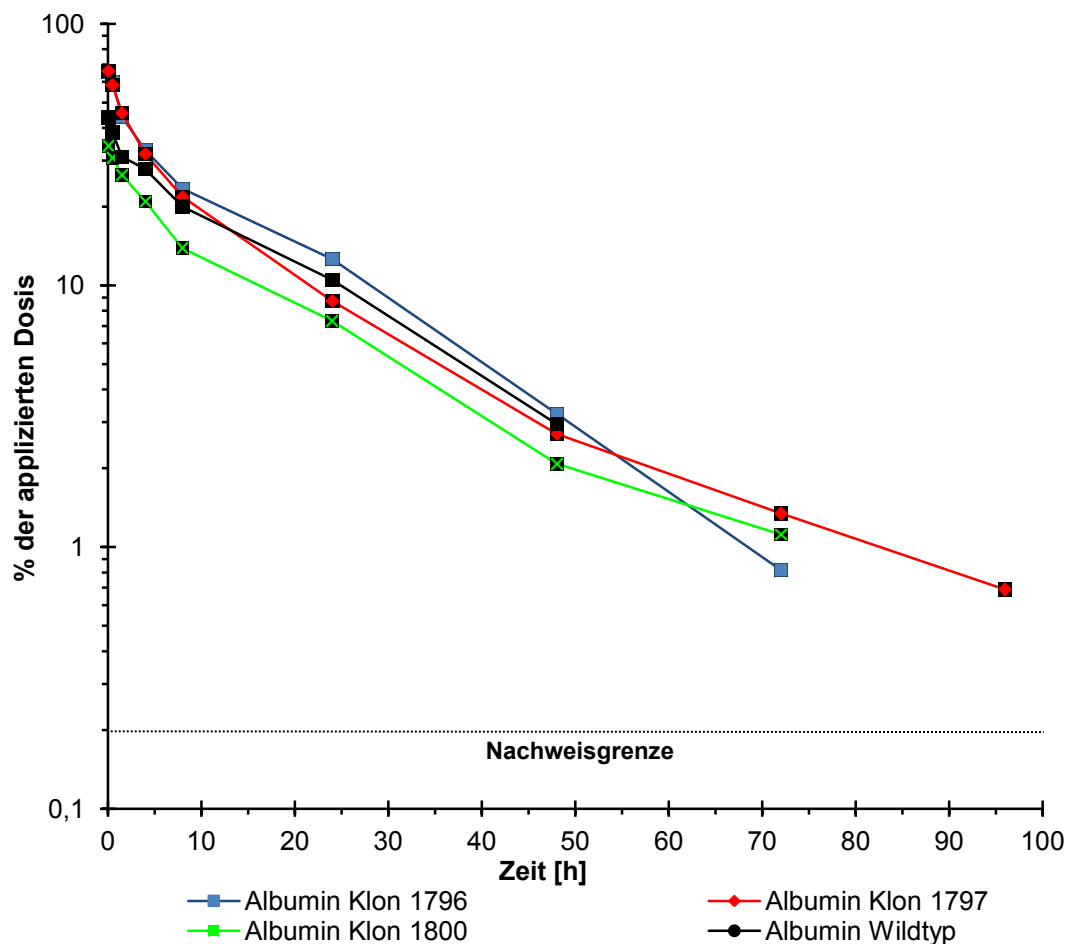


Abb. 3.26:

**Pharmakokinetik PSR-12-08 Abbau alanisierter Albumine in halblogarithmischer Darstellung in der Ratte**

In einer ersten Pharmakokinetikstudie wurden vier Albuminvarianten untersucht und ausgewertet. Der Albumin Wildtyp, der Albuminklon 1796, bei dem die Aminosäuresequenz KHPEAK durch sechs Alanine ersetzt wurde. Der Albuminklon 1797, bei dem die Aminosäuresequenz KTPV durch vier Alanine ersetzt wurde, sowie der Albuminklon 1800 bei dem die Aminosäuresequenz KADDKET durch Alanine ersetzt wurde.

Für alle untersuchten Albumine gilt: Es findet ein vergleichbarer Abbau statt, die negativen Steigungen der Graphen sind zu den verschiedenen Zeitpunkten zwischen 0 und 48 Stunden vergleichbar. Zwischen 48 und 72 Stunden wird Klon 1796 schneller abgebaut als die Klone 1797 und 1800, der Wildtyp ist dagegen schon nicht mehr nachweisbar. Die Klone 1796 und 1800 sind nach 72 Stunden ebenfalls nicht mehr nachzuweisen, der Klon 1797 ist dagegen noch nach 96 Stunden nachweisbar.



Vernachlässigt man die sich deutlich unterscheidenden Wiederfindungsraten, liegen die Graphen nahezu aufeinander. Die Unterschiede der Mutanten zum Wildtyp sind zu marginal um einen beschleunigten Abbau daraus abzulesen und daraus wiederum eine für den Abbau verantwortliche Bindestelle zum FcRn abzuleiten. Die bei den drei Albuminmutanten alaninisierten Aminosäuren haben offensichtlich keinen Einfluss auf die Halbwertszeit von Albumin. Sollte die Halbwertszeit von Albumin tatsächlich derart stark mit der Bindung zum FcRn korrelieren, wie in der Literatur (Andersen C.L. 2006) beschrieben, scheiden diese alaninisierten Aminosäuresequenzen auch als potentielle Bindestellen zum FcRn aus.

In einer weiteren Pharmakokinetikstudie wurden die folgenden Albuminmutanten untersucht und der Albumin Wildtyp zur Kontrolle erneut getestet. Der Albuminklon 1798, bei dem die Aminosäuresequenz ETYVPKEFNAE durch elf Alanine ersetzt wurde. Des Weiteren der Albuminklon 1954, bei welchem die Aminosäuresequenz KATKE durch fünf Alanine ersetzt wurde. Der Albuminklon 1801, bei dem die Aminosäuresequenz KLVAASSQAA durch zwölf Alanine ersetzt wurde und der Albuminklon 1815 bei dem die Aminosäuresequenz KADDKET und das Threonin an Stelle 515 durch Alanine ersetzt wurden.

Der Klon 1801 zeigt ein Abbauverhalten, welches dem Wildtyp Albumin ebenso stark gleicht wie die drei zuvor getesteten Albuminvarianten (vgl. Abb. 7.23). Demnach hat die Aminosäuresequenz KLVAASSQAA ebenfalls keinen Einfluss auf die Halbwertszeit von Albumin und in Folge dessen scheidet diese als mögliche Bindungsstelle zum FcRn ebenfalls aus.

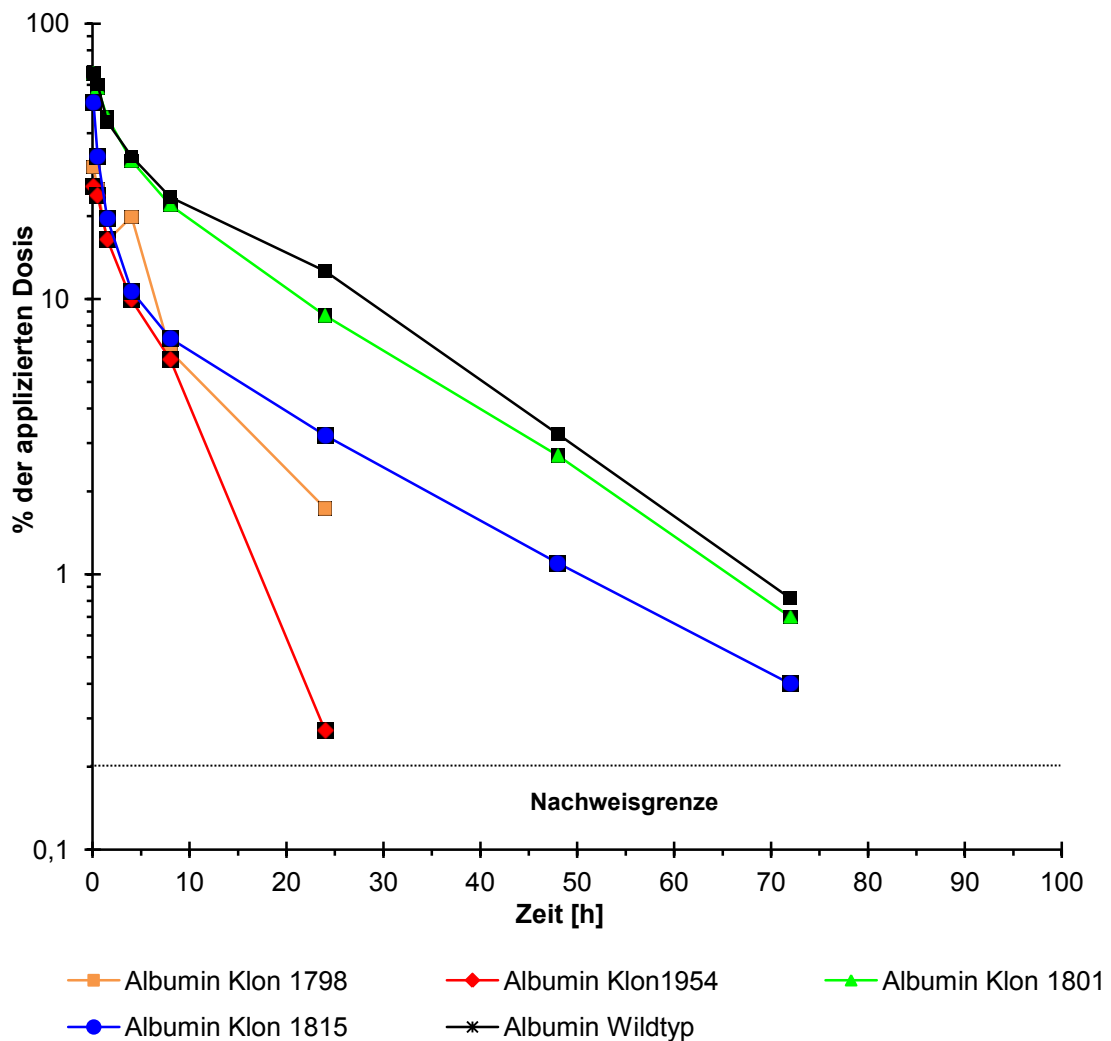


Abb. 3.27:

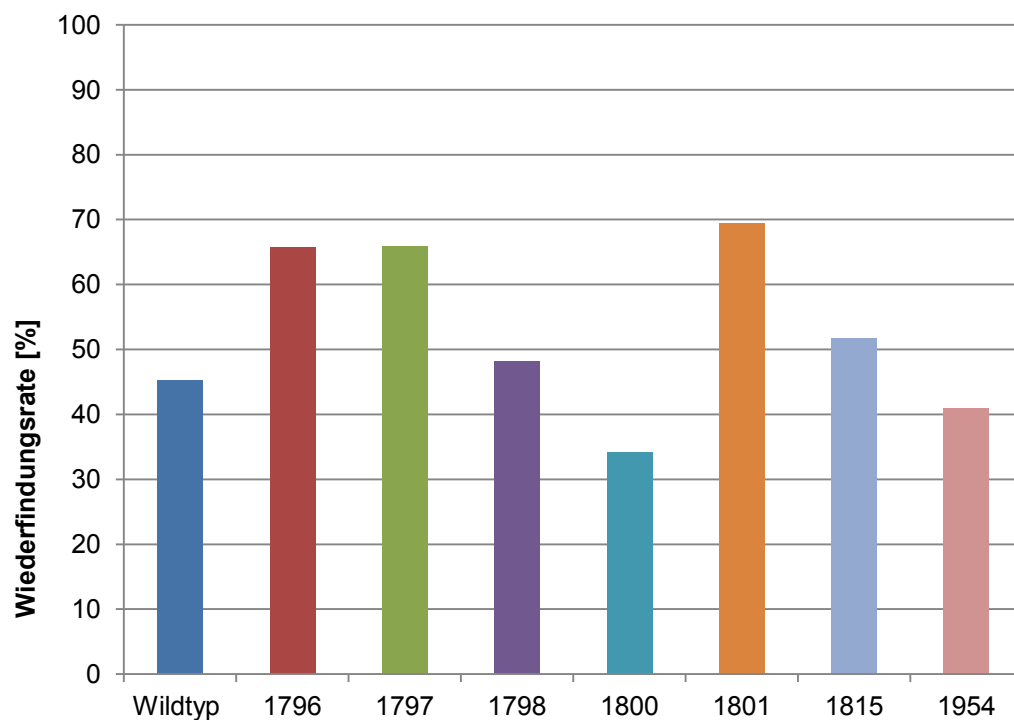
Pharmakokinetik PSR-15-09 Albumine in halblogarithmischer Darstellung in der Ratte

Die Albuminvariante 1815 zeigt ein deutlich differenziertes Abbauverhalten zum Wildtyp Albumin und zur Albuminvariante 1800. Die Albuminvariante 1815 unterscheidet sich von der Variante 1800 nur durch ein zusätzliches alanisiertes Threonin, neben der bei beiden Varianten alanisierten Sequenz KADDKET. Dem zufolge bewirkt das zusätzliche alanisierte Threonin 515 einen deutlich beschleunigten Abbau des Albumins in den ersten acht Stunden. Die Albuminvariante 1815 ist allerdings noch nach 72 Stunden nachweisbar und erfährt von der Stunde acht bis zur Stunde 72 einen Abbau, der dem Wildtyp Albumin sehr ähnlich ist. Es handelt sich hierbei eindeutig um eine Abbaukinetik in zwei Phasen. Diese kann ein Hinweis auf nicht korrekt gefaltete sein, oder aber partiell denaturierter Proteine sein.

Die Albuminvarianten 1798 und 1954 dagegen zeigen einen deutlich beschleunigten Abbau in der Ratte; beide sind bereits nach 48 Stunden nicht mehr nachweisbar. Beide Kinetiken verlaufen während der ersten acht Stunden vergleichbar mit der von Albuminvariante 1815. Im Gegensatz zur Albuminvariante 1815 erfährt die Variante 1954 auch nach acht Stunden noch einen starken Abbau und ist bereits nach 24 Stunden nicht mehr nachweisbar. Die Variante 1798 erfährt zwischen der achten Stunde und Stunde 24 in der Ratte einen ebenfalls stärkeren Abbau verglichen mit dem Wildtyp Albumin, aber nicht ganz so schnell wie Variante 1954. Der Anstieg des Albumins bei Variante 1798 beim Messwert der Stunde vier ist durch einen Wechsel der Gruppe bei der Blutentnahme zu erklären.

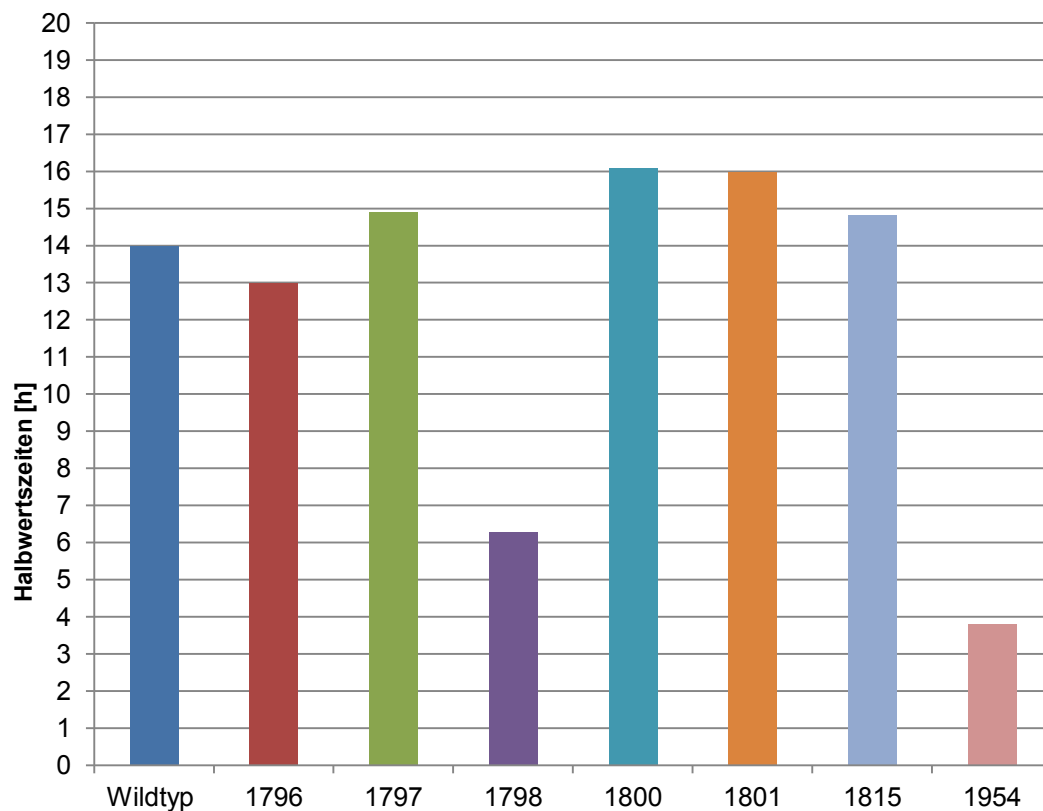
Die Albuminvariante 1954 ist mit Abstand die, die am schnellsten abgebaut wird. Folglich hat die Aminosäuresequenz KATKE offensichtlich einen starken Einfluss auf die Halbwertszeit von Albumin und kommt als potentielle Bindestelle zum FcRn in Betracht.

Die Albuminvariante 1798 wird deutlich schneller abgebaut als Wildtyp Albumin aber nicht ganz so schnell wie Variante 1954. Dem Kurvenverlauf nach zu urteilen hat sie einen Einfluss auf die Halbwertszeit von Albumin, wenn auch einen nicht ganz so großen wie die Variante 1954. Sie ist als Bindestelle zu FcRn nicht auszuschließen.

**Abb. 3.28:****Wiederfindungsraten alanisierter Albumine in der Übersicht**

Die Wiederfindungsraten der Albumine unterliegen starken Schwankungen, wofür es diverse Ursachen geben kann. Eine Ungenauigkeit des Tests durch unterschiedliche Affinitäten der Antikörper zu den unterschiedlichen Albuminvarianten wurde durch die Verwendung der jeweiligen bestimmten Variante als Standard ausgeschlossen.

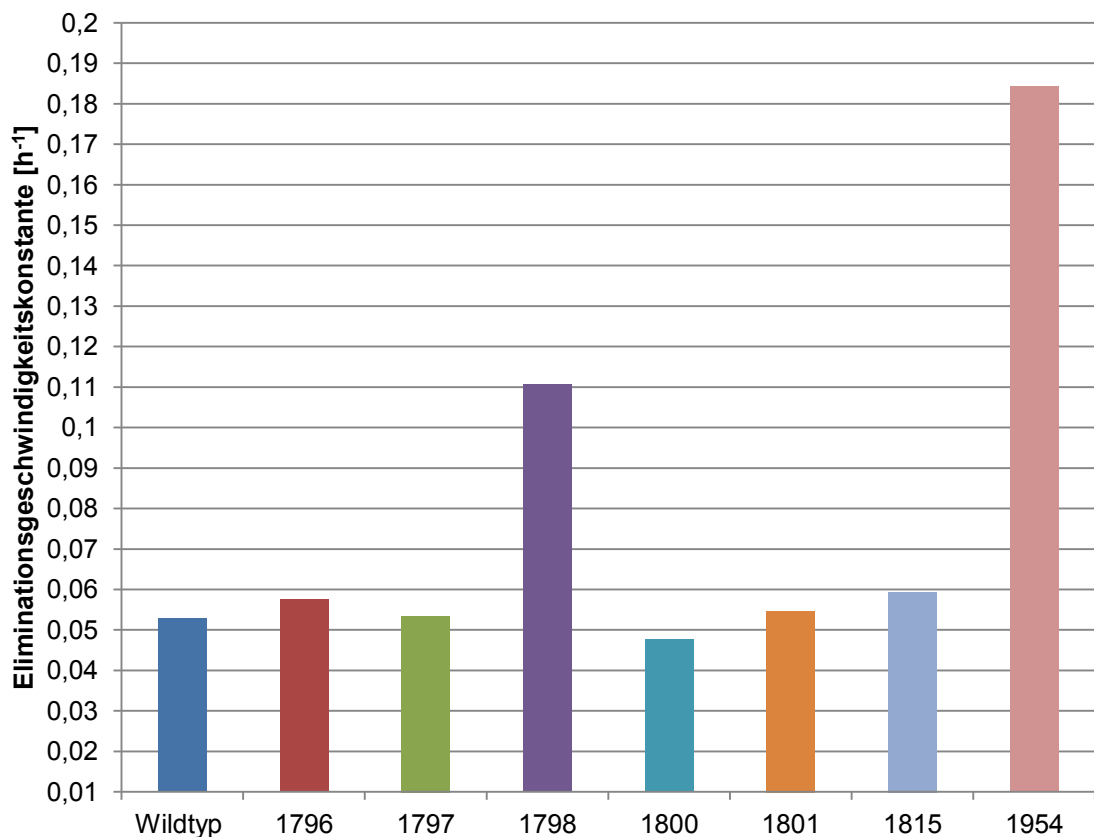
Die relativ starke Schwankung derer Wiederfindungsraten zwischen ca. 35% und ca. 68%, hat aber keinen Einfluss auf Parameter wie die Halbwertszeit und die Wiederfindungsrate. Beide korrelieren in keinster Weise mit der Wiederfindungsrate.



**Abb. 3.29:**  
**Halbwertszeiten alanisierter Albumine in der Übersicht**

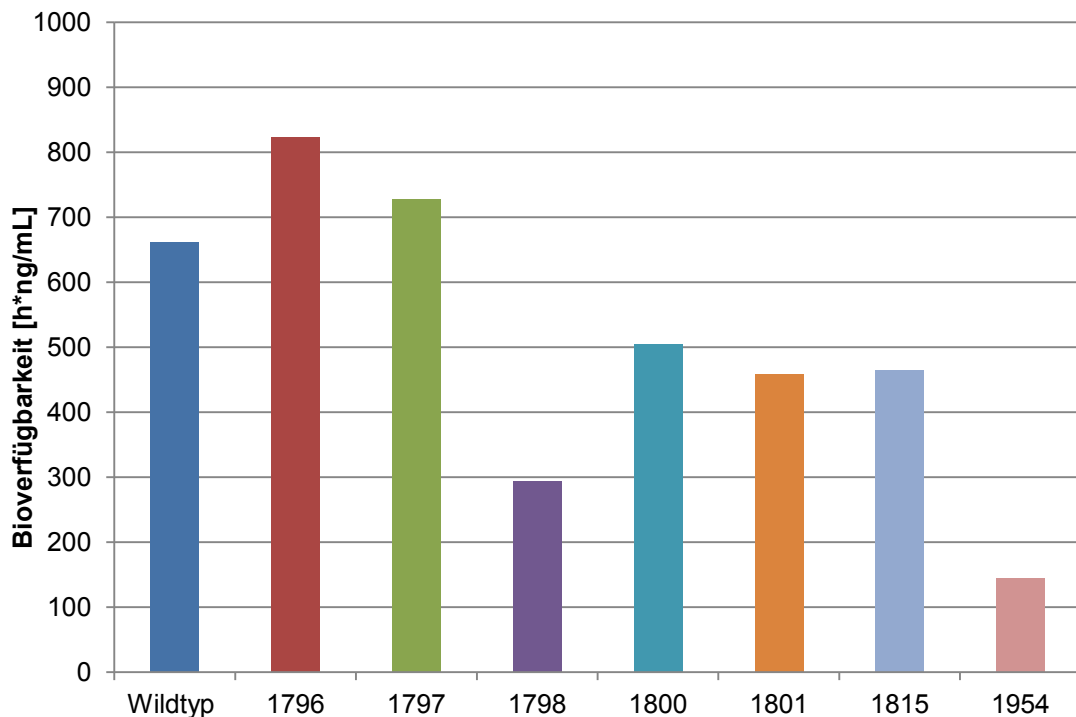
Die Halbwertszeiten der Albumine entsprechen den Zeiten, bei der die Hälfte der applizierten Dosis abgebaut wurde, ausgehend von der Wiederfindungsrate. Sie wurden durch lineare Regression der halblogarithmischen Auftragung der gemessenen Konzentration gegen die Zeit der Messpunkte und unter Berücksichtigung der daraus resultierenden Eliminationsgeschwindigkeitskonstanten berechnet (s. h. Kap. 2.5.2).

Die Halbwertszeiten der Albuminvarianten 1796, 1797, 1800, 801 und 1815 liegen zwischen 13 und 16 Stunden, die vom Wildtyp liegt bei 14 Stunden. Dagegen liegen die Halbwertszeiten der Albuminvarianten 1954 und 1798 bei nur 3,8 und 6,9 Stunden und sind damit erheblich kürzer als die des Wildtyps.

**Abb. 3.30:****Eliminationsgeschwindigkeitskonstanten alanisierter Albumine in der Übersicht**

Die Eliminationsgeschwindigkeitskonstante ist ein Maß für die Geschwindigkeit des Abbaus eines bestimmten Stoffes über die Zeit und macht deren Abbau untereinander vergleichbar. Die Berechnung der Eliminationsgeschwindigkeitskonstanten beruht auf der Annahme, dass eine Kinetik erster Ordnung beim Abbau von Stoffen im Tier vorliegt. Die Berechnung ist in Kap. 2.5.2 detailliert beschrieben.

Die Eliminationsgeschwindigkeitskonstanten bestätigen die aus den graphischen Verläufen der Abbaukinetiken gezogenen Schlüsse ebenso wie die Halbwertszeiten. Die Albuminvariante 1798 weist eine nahezu doppelt so hohe Eliminationsgeschwindigkeit verglichen mit dem Albumin Wildtyp und den anderen Albuminvarianten auf, die Albuminvariante 1954 gar eine dreifache Erhöhung.



**Abb. 3.31:**  
**Bioverfügbarkeit alanisierter Albumine in der Übersicht**

Die Bioverfügbarkeit ist ein Maß für die Exposition des Körpers gegenüber einer Wirksubstanz, diese wurde über die Integration der halblogarithmischen Auftragung der gemessenen Konzentration gegen die Zeit der Messpunkte berechnet (vgl. Kap. 2.5.2). Sie zeigt ebenfalls eine Korrelation mit der Halbwertszeit und der Eliminationsgeschwindigkeitskonstante. Die Ratten sind der Albuminvariante 1954 über 140 h\*ng/mL ausgesetzt. Der Albuminvariante 1798 dagegen für 290 h\*ng/mL und anderen Albuminvarianten mehr als doppelt so lange, wie z. B. dem Wildtyp mit 670 h ng/mL.

Die erstellten Kinetiken gaben Anlass zur Untersuchung folgender aufgetretener Auffälligkeiten: Die Mutationen in den Albuminvarianten 1954 und 1798 führten zu einem beschleunigten Abbau derer. Zur näheren Eingrenzung der für den beschleunigten Abbau verantwortlichen Aminosäuren oder zur Verzögerung deren Abbaus wurden weitere Albuminvarianten mit Punktmutationen an den auffällig gewordenen Sequenzen, insbesondere an der Aminosäuresequenz KATKE, hergestellt und deren Abbau in einer weiteren Pharmakokinetikstudie untersucht.

Parallel dazu wurden Bindungsstudien mittels SPR Technik durchgeführt durch die eine potentielle Korrelation des in den Pharmakokinetikstudien gezeigten Abbaus und einer Bindungskinetik zum FcRn belegt werden könnte (vgl. Kap. 3.5.5).

Von den Albuminvarianten mit einem verkürzten Abbau wurden CD-Spektren und Schmelzkurven aufgezeichnet, um einen beschleunigten Abbau in Folge einer vom Wildtyp Albumin abweichenden Faltung der Varianten auszuschließen (vgl. Kap. 3.6). Aufgrund der dabei festgestellten zu stark vom Wildtyp Albumin abweichenden Sekundärstruktur der Albuminvariante 1815 wurden im Bereich dieser Aminosäuresequenz keine weiteren Punktmutationen hergestellt.

### **3.4.2 Abbaukinetik punktmutierter Albumine in der Ratte**

Die Abbaukinetik der punktmutierten Albumine in der Ratte lassen in halblogarithmischer Auftragung der Konzentration ausgehend von der Wiederfindungsrate gegen Zeitpunkte der Probennahme Schlüsse auf die Art des Abbaus zu.

Untersucht wurde das Abbauverhalten fünf punktmutierter Albumine in der Ratte. Dabei wurden an der im Kapitel 3.4.1 alaninisierten Aminosäuresequenz der Albuminvariante 1798 die erste und letzte Glutaminsäure alanisiert, um den zuvor gezeigten beschleunigten Abbau auf diese beiden Glutaminsäuren einzugrenzen. Von der zuvor alaninisierten Aminosäuresequenz KATKE, der Albuminvariante 1954 wurden folgende Punktmutation auf deren Abbauverhalten in der Ratte getestet. Das erste Lysin der Aminosäureabfolge KATKE wurde in Albuminvariante 2129 durch ein Alanin ersetzt um den beschleunigten Abbau auf diese AS einzugrenzen. Weiter wurde das erste Lysin der AS Sequenz KATKE in den Albuminvarianten 2166 und 2167 durch Glutamin und Histidin ersetzt, um den Abbau der Varianten zu verzögern. Bei der Albuminvariante 2168 wurde zum dem gleichen Zweck die Glutaminsäure der Sequenz KATKE durch Asparaginsäure ersetzt.



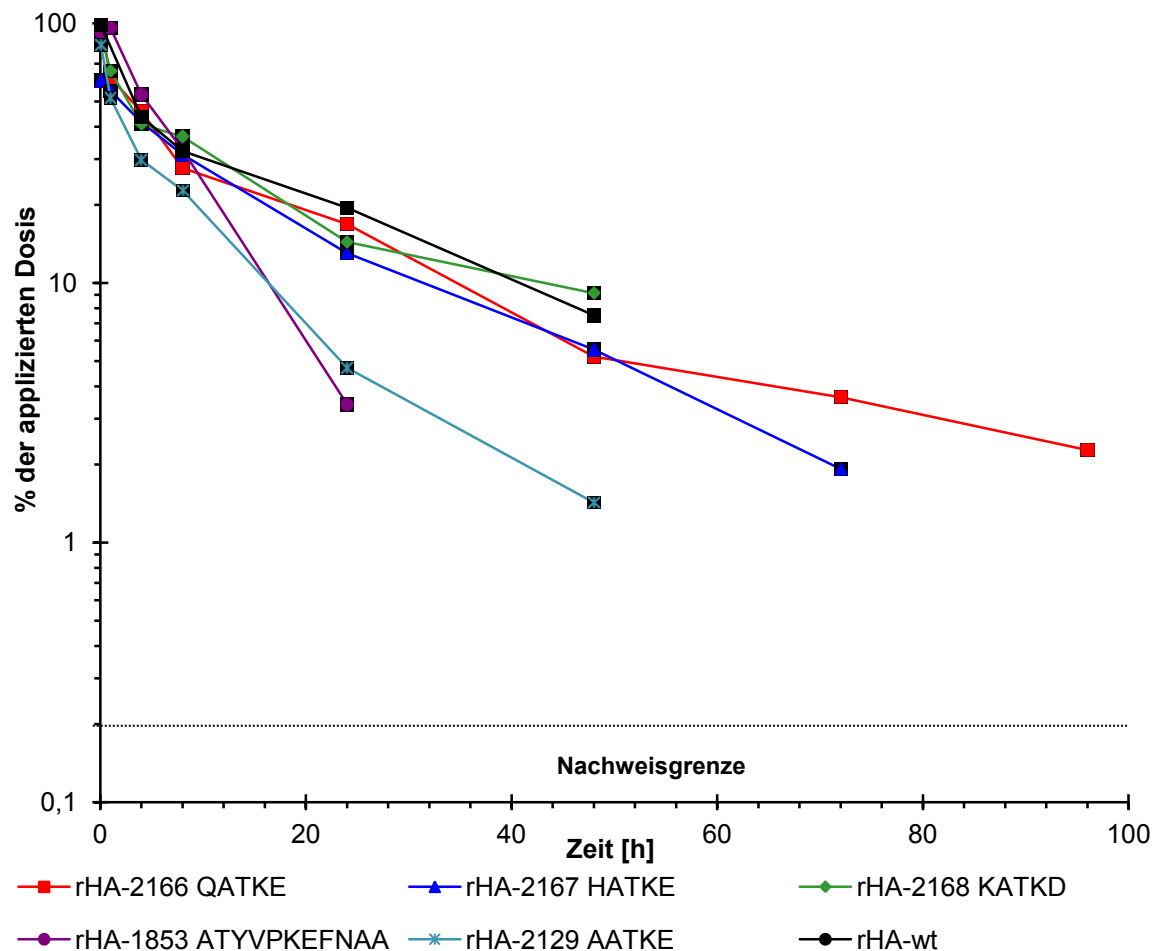


Abb. 3.32:

**Pharmakokinetik PSR 13-10 punktmutierter Albumine in halblogarithmischer Darstellung**

Für die punktmutierten Albumine 2166, 2167 und 2168 weisen während der ersten 48 Stunden keine nennenswerten Unterschiede in Ihrem Abbauverhalten auf. Während die Albuminvariante 2168 bereits nach 72 Stunden der Applikation nicht mehr nachweisbar ist, ist die Variante 2167 mit der Punktmutation am ersten Lysin erst ab 96 Stunden nicht mehr nachzuweisen. Die Punktmutante 2166 ist sogar erst nach 120 Stunden nicht mehr nachweisbar. Dennoch verläuft der Graph von 2166 zwischen der Stunde 48 und der Stunde 96 relativ flach zwischen 6% und 2% der applizierten Menge, so dass die relativ lange Nachweisbarkeit keinen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit hat. Die Unterschiede dieser genannten Punktmutanten zum Wildtyp sind zu marginal um auf einen beschleunigten oder verzögerten Abbau in die Graphiken hinein zu interpretieren. Sie hat damit wenn überhaupt nur einen zu vernachlässigenden Einfluss auf die Halbwertszeit von Albumin.

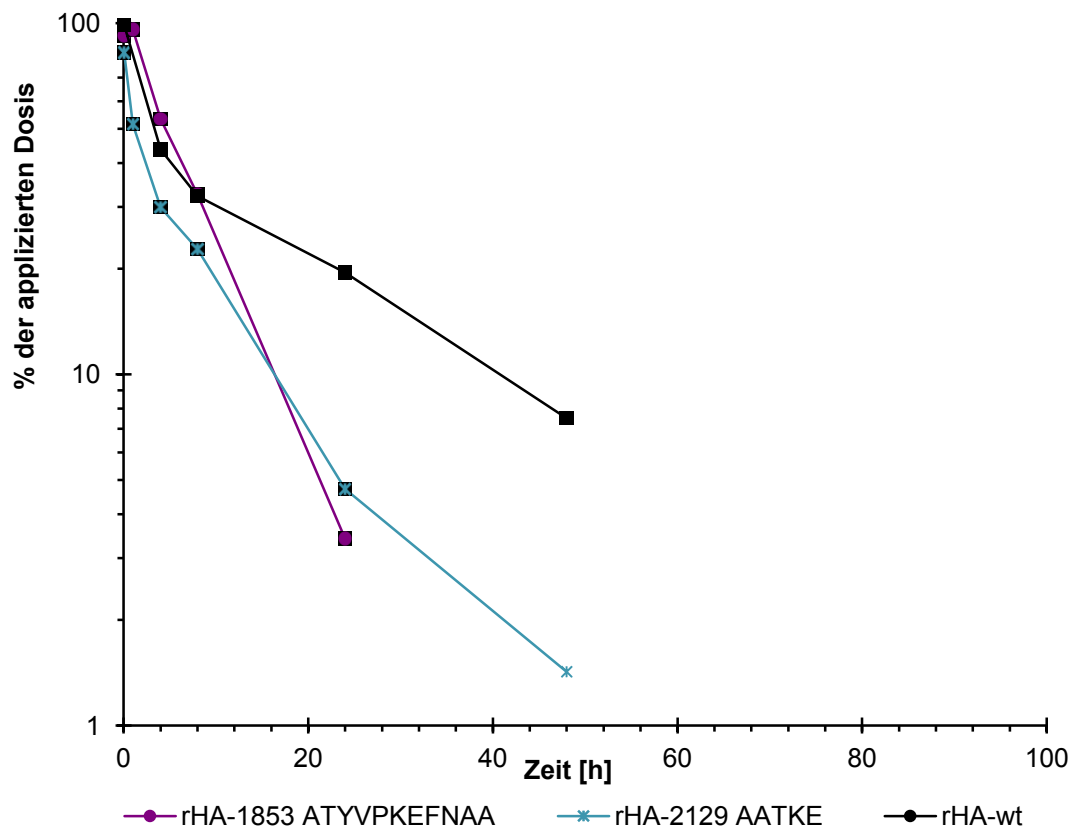
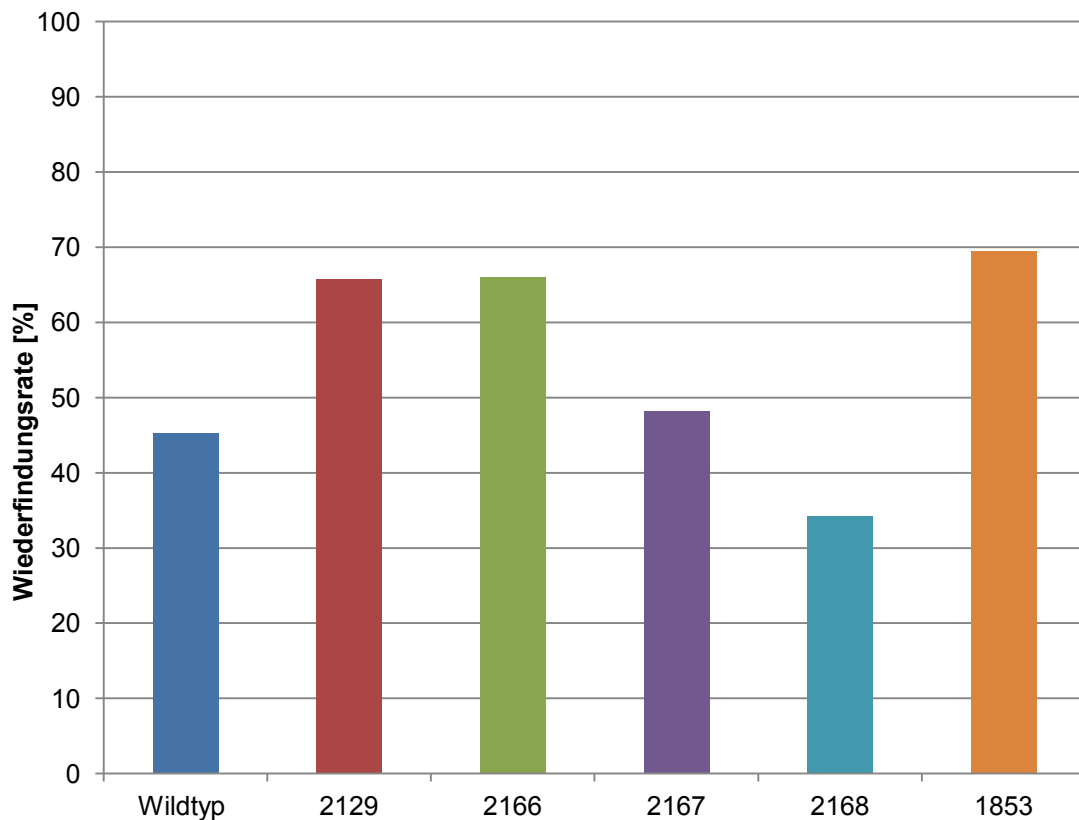


Abb. 3.33:

**Pharmakokinetik PSR-13-10 Auswahl auffälliger punktmutierter Albumine in halblogarithmischer Darstellung**

Die Punktmutanten 2129 und 1853 weisen einen beschleunigten Abbau in der Ratte auf. Die Albuminvariante 2129, bei der das erste Lysin aus der AS Sequenz KATKE alanisiert wurde, unterliegt bereits während der ersten vier Stunden nach der Applikation einem deutlich schnelleren Abbau als der Wildtyp. Zwischen Stunde 24 und 48 nach Applikation verlangsamt sich der Abbau und der Graph entspricht in seiner negativen Steigung nahezu der des Wildtyp Albumins zu den entsprechenden Entnahmezeitpunkten. Sowohl Variante 2129 als auch der Wildtyp Albumin sind nach 72 Stunden nicht mehr nachweisbar. Bei der doppelten Punktmutation der ersten und letzten Glutaminsäure der AS Sequenz ETVPKEFNAE erfolgt der Abbau während der ersten vier Stunden nach der Applikation nicht ganz so schnell wie bei Variante 2129 und dem Wildtyp Albumin. Während er aber zwischen Stunde vier und 24 deutlich

schneller erfolgt als beim Wildtyp und der Albuminvariante 2129. Die negative Steigung des Graphen über den Abbau von 1853 verläuft relativ konstant über die gesamte Zeit, woraus man einen geregelten Abbaumechanismus ableiten könnte. Die doppelte Punktmutante 1853 ist bereits nach 48 Stunden nicht mehr nachweisbar.

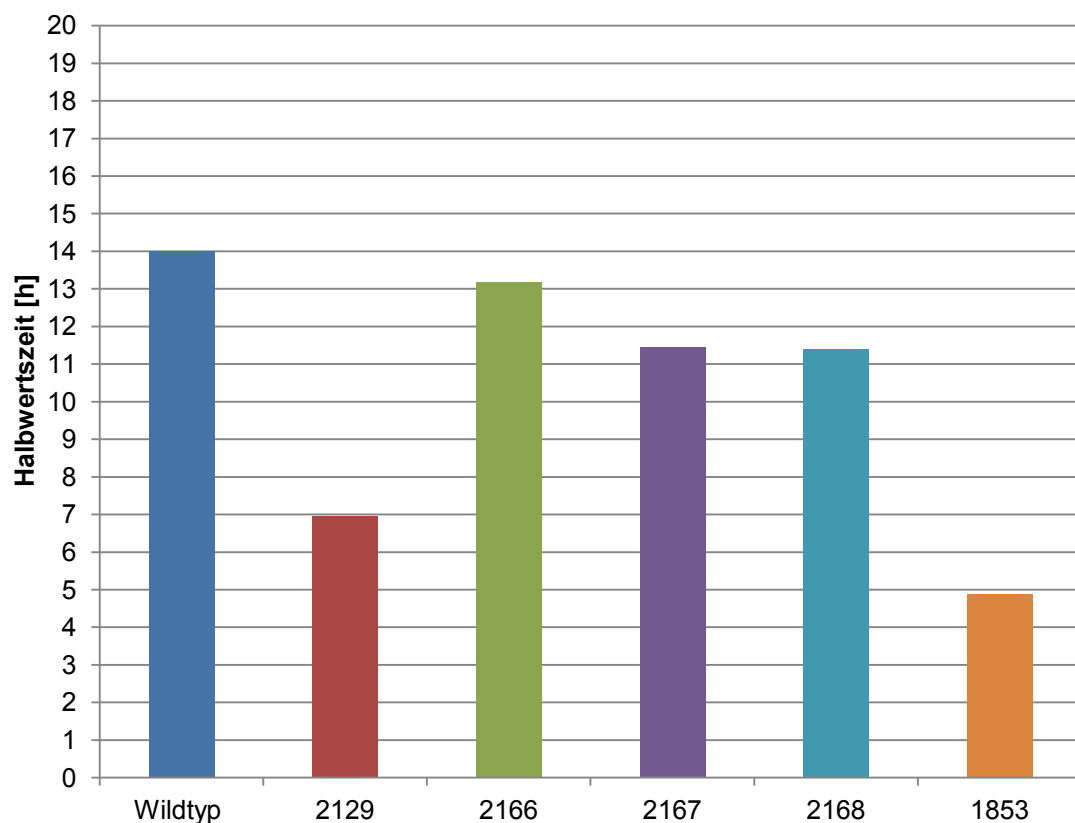


**Abb. 3.34:**

**Wiederfindungsrate punktmutierter Albumine in der Übersicht**

Die Wiederfindungsraten differieren wie auch in den beiden vorherigen Studien relativ stark zwischen 35% und 68%. Die Wiederfindungsraten der Albuminvarianten 2129, 2166 und 1853 liegen um ca. ein Drittel höher als die des Wildtyp Albumins. Darin besteht eine mögliche Erklärung der sehr langen Nachweisbarkeit von 2166 von bis zu 120 Stunden

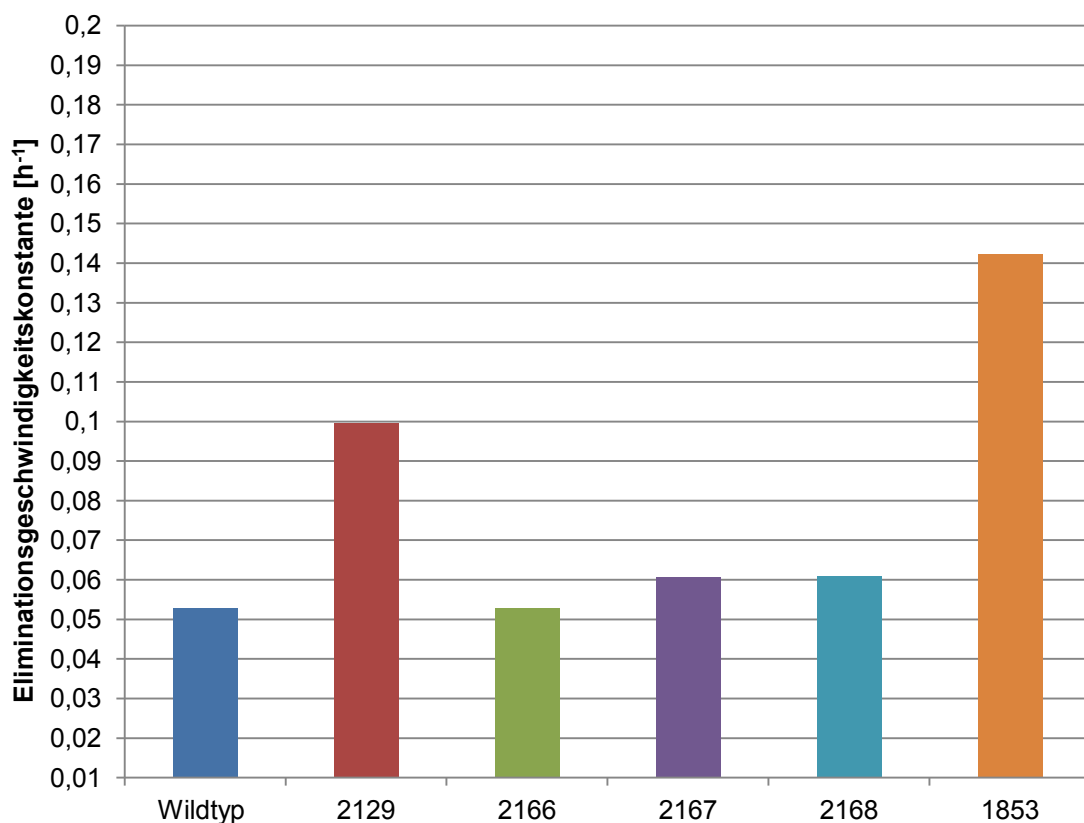
Dagegen unterstreicht die hohe Wiederfindungsrate der beiden Punktmutanten 2129 und 1853 nur den im Verhältnis zum Wildtypen ähnlich schnellen Abbau.



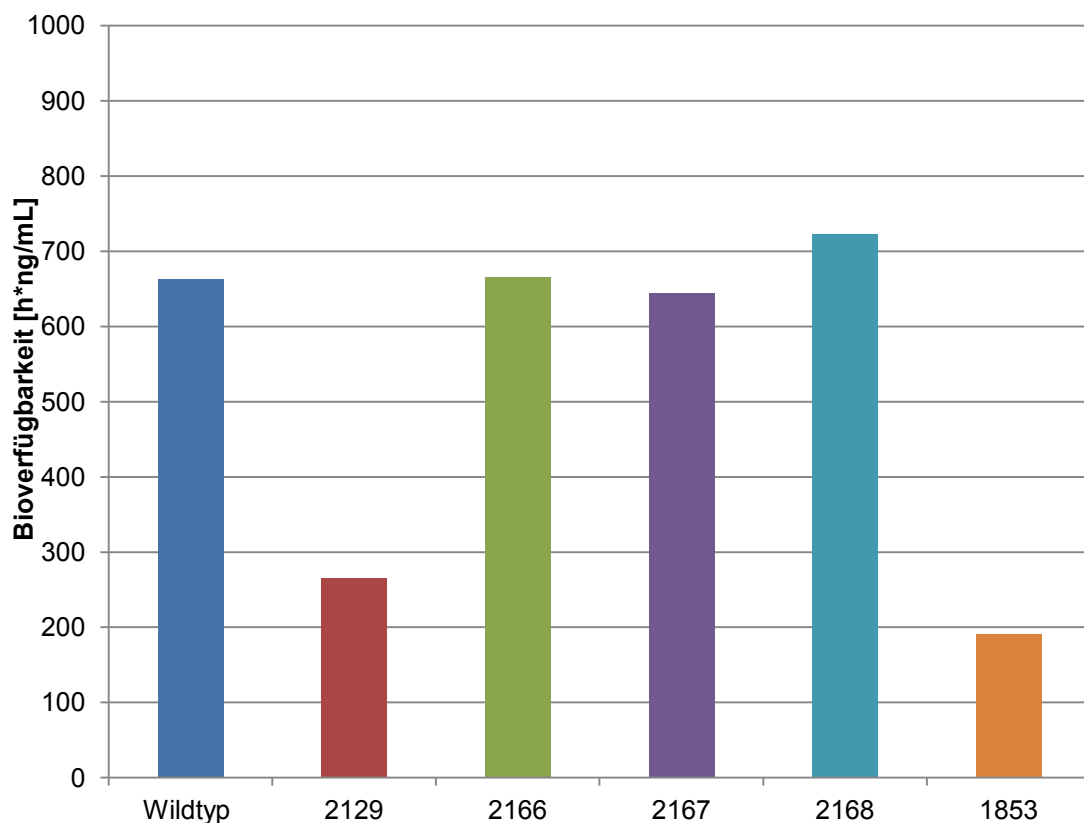
**Abb. 3.35:**  
**Halbwertszeit punktmutierter Albumine in der Übersicht**

Die Halbwertszeit gilt als die wichtigste Kennzahl einer Pharmakokinetikstudie, die spiegelt den relativ geringen Unterschied der Albuminvarianten 2167 und 2168 verglichen mit dem Wildtyp Albumin wieder. Hier wird auch noch einmal der vergleichbare Abbau zum Wildtyp Albumin der Variante 2166 deutlich, deren Halbwertszeit kürzer ist als die des Wildtyps, obwohl sie noch zwei Tage länger im Tier nachweisbar ist.

Die Halbwertszeit von unter fünf Stunden für die schnell und konstant abgebaute Variante 1853 entspricht nur ca. einem Drittel der Halbwertszeit des Wildtyps. Die Halbwertszeit der Variante 2129 von unter sieben Stunden entspricht in etwa der Hälfte der des Albumin Wildtyps.

**Abb. 3.36:****Eliminationsgeschwindigkeitskonstanten punktmutierter Albumine in der Übersicht**

Die Eliminierungsrate korreliert sehr deutlich mit den Halbwertszeiten. Für alle erstellten Kinetiken gilt die Beziehung: Je kürzer die Halbwertszeit, desto größer ist die Eliminationsgeschwindigkeitskonstante. Die Eliminationsgeschwindigkeitskonstante für die Albuminvariante 2129 ist ca. doppelt so hoch wie die des Wildtyp Albumins, die der Albuminvariante 1853 dagegen verglichen mit dem Wildtyp Albumin ca. dreimal so hoch. Demnach verhalten sich auch deren Verhältnisse umgekehrt proportional zu deren Halbwertszeiten.

**Abb. 3.37:****Bioverfügbarkeit punktmutierter Albumine in der Übersicht**

Die Bioverfügbarkeit ist ein Maß für die Exposition des Tieres gegenüber einer Wirksubstanz, sie wurde über die Integration der halblogarithmischen Auftragung der gemessenen Konzentration gegen die Zeit der Messpunkte berechnet (vgl. Kap. 2.5.2). Sie zeigt ebenfalls eine Korrelation mit der Halbwertszeit und der Eliminationsgeschwindigkeitskonstanten. Die Ratten sind der Albuminvariante 1853 nur über 190 h\*ng/mL ausgesetzt, der Albuminvariante 2129 dagegen für 265 h\*ng/mL und anderen Albuminvarianten mehr als doppelt so lange, wie z. B. dem Wildtyp mit 670 h\*ng/mL. Die erstellten Kinetiken gaben Anlass zu folgenden Schlüssen: Das Lysin an Stelle 562 im Albumin hat offensichtlich einen starken Einfluss auf den Abbau von Albumin in der Ratte. Bei dessen Alanisierung beträgt die Halbwertszeit nur ca. die Hälfte, verglichen mit dem Wildtyp Albumin.

Die beiden Glutamine an den Stellen 519 und 529 bewirken eine verkürzte Halbwertszeit von ca. einem Drittel verglichen mit dem Wildtyp Albumin. Welche der beiden AS dafür verantwortlich ist oder ob eine Kombination beider dazu führt, bleibt zunächst offen.

### 3.5 SPR Bindungsstudien

Zur Charakterisierung der Bindung zwischen dem humanen FcRn und den mutierten Albuminen (s.h. Tab. 3.2) wurden durch *surface plasmon resonance* zahlreiche Bindungstests durchgeführt und Kinetiken erstellt.

Dazu wurde sowohl der FcRn an einen *chip* immobilisiert und die Interaktionen zu den Albuminmutanten in einer mobilen Phase bestimmt, wie auch mit umgekehrten Phasen, wobei Albumin immobilisiert wurde und sich in der FcRn mobilen Phase befand.

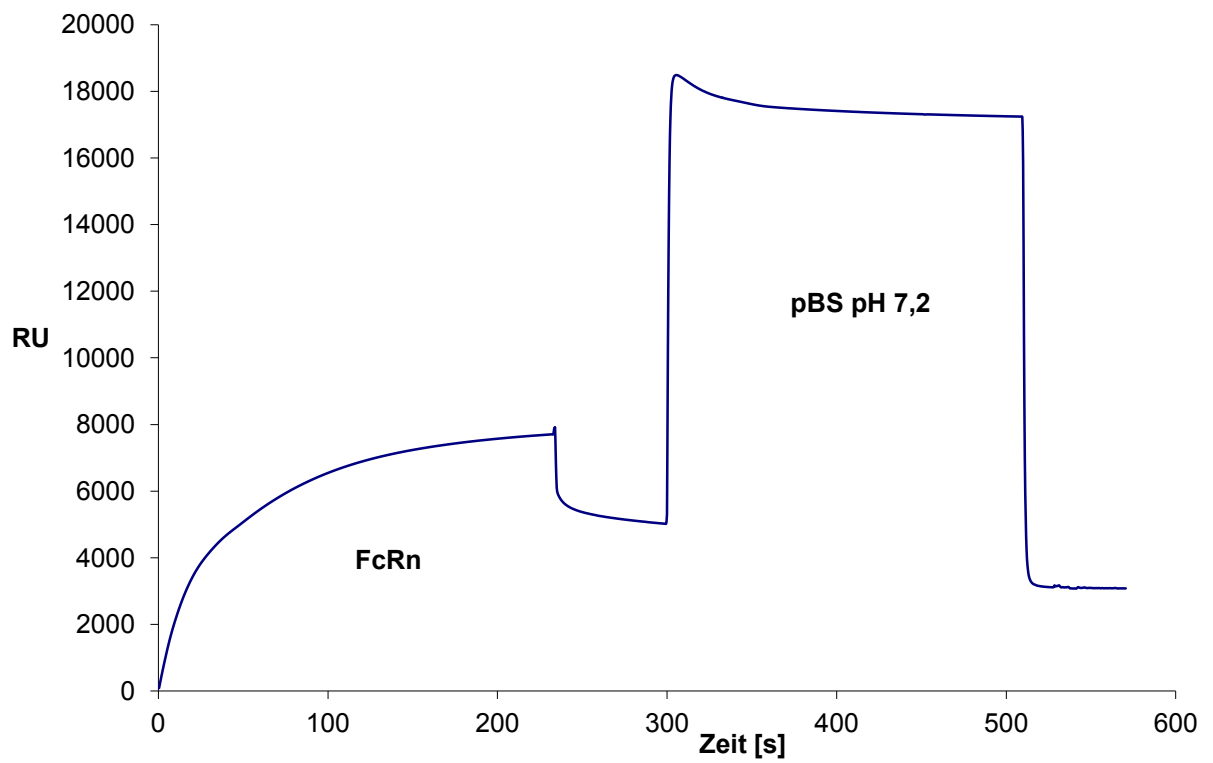
#### 3.5.1 Elektrostatiken FcRn und rHA

Als Vorversuche zur Immobilisierung von FcRn und Albumin wurden Elektrostatiken erstellt, diese dienten zur Ermittlung des dabei optimalen pH Wertes. Dazu wurde das zu Immobilisierende Protein in Natriumacetatpuffer bei pH 4, pH 4,5, pH 5 und pH 5,5 über einen unbehandelten *CM 3 chip* geleitet. Der pH Wert, bei dem das zu bindende Protein die größte Änderung des Brechungsindex aufwies und damit die größte Affinität zum *CM 3 chip* hatte, war für die Immobilisierung optimal.

Bei FcRn war dies für den pH Wert von 4,5 zutreffend (vgl. Abb. 7.40 im Anhang), für Albumin wurde ein pH Wert von 5,0 (vgl. Abb. 7.41 im Anhang) bestimmt.

#### 3.5.2 Immobilisierung von FcRn und Albumin am CM3 Chip

Der FcRn wurde kovalent durch FcRn-ständige Aminogruppen an den Chip gebunden, die Kopplungschemie bestand aus NHS und EDC (vgl. Kap. 0). Zur Kopplung wurde der FcRn in Natriumacetatpuffer bei dem vorher in einer Elektrostatik ermittelten pH Wert auf den Chip aufgetragen. Anschließend erfolgte ein Waschschrift, um den *chip* von ungebundenem FcRn zu reinigen (s. h. Abb. 3.38). Nach der Kopplungsreaktion folgte ein Inaktivierungsschritt der verbliebenen reaktiven Gruppen auf dem Chip durch Ethanolamin.

**Abb. 3.38:****Immobilisierung von FcRn an einen CM3 Chip**

Bei der in Abb. 3.38 gezeigten Immobilisierung wurde die Menge FcRn an den *chip* gekoppelt, die eine Änderung des Reflexionswinkels von 3100 *response units* bewirkte. Auf dem *chip* wurde eine weitere Flusszelle als Referenzzelle definiert, bei dieser wurde mit der gleichen Kopplungschemie aktiviert. Statt ein zu immobilisierendes Protein aufzutragen wurden die reaktiven Gruppen direkt mit Ethanolamin abgesättigt. Eine kovalente Immobilisierung von Albuminmutanten erfolgte entsprechend der beschriebenen Methode zum FcRn, jedoch wurde für Albumin der pH Wert von 5,0 in einem Elektrostatisversuch (vgl. Abb. 7.41) ermittelt und in einer Kopplungsreaktion entsprechend angepasst. Bei einer Kopplungsreaktion von rHA wildtyp konnte die Masse entsprechend 4700 *response units* kovalent an einen *chip* gebunden werden (vgl. Abb. 7.42).



### 3.5.3 Funktionstest von FcRn im Hinblick auf eine Bindung mit IgG und HSA

Der FcRn und seine Subdomäne  $\beta$ -2-Mikroglobulin wurden auf Basis zweier verschiedener Plasmide auf CHO Zellen transfiziert und exprimiert. Dabei wurde sowohl die Expression als auch das gereinigte Protein nur durch SDS-PAGE und Western Blot qualitativ analysiert, eine Analyse bezüglich seiner Funktion fand während dessen nicht statt.

Um den produzierten FcRn auf seine Eignung als Bindungspartner für unterschiedlich analysierte Albumine zu prüfen, wurden bisher veröffentlichte Bindungskinetiken von FcRn zu IgG und zu Albumin im SPR überprüft. (Q. J. Andersen J.T. 2006)(Chaudhury C. 2006)

Als erster Schritt dazu wurde die bekannte Affinität von FcRn zu IgG bei pH 5,5, nicht jedoch bei physiologischem pH Wert überprüft (Raghavan M. 1995). Dazu wurde ein plasmatisches IgG Präparat mit einer Konzentration von 20  $\mu\text{g/mL}$  in HEPES Puffer mit pH 5,5 in der mobilen Phase über einen *chip* geleitet, an dem der FcRn immobilisiert worden war (s. h. Abb. 3.39). Dabei wurde eine Bindung beobachtet.

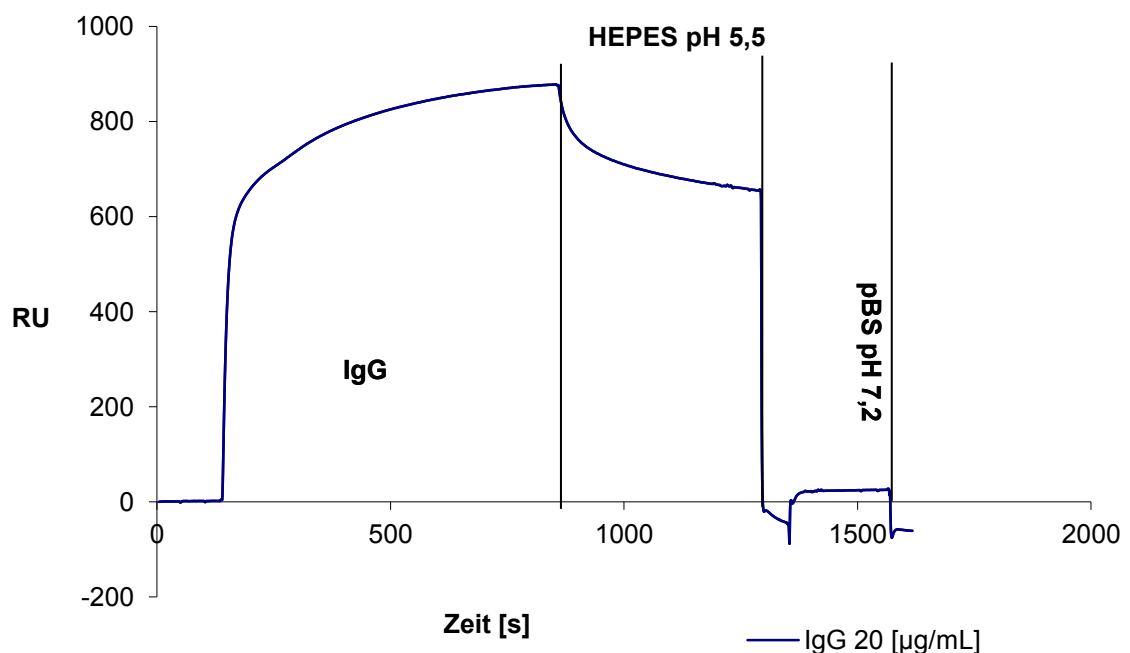


Abb. 3.39:

IgG (Vivaglobin <sup>TM</sup>) in mobiler Phase, FcRn in der Festphase

Weiter wurde mit dem Probenpuffer gewaschen und dabei eine Dissoziation beobachtet. Zur Elution des IgG vom FcRn wurde mit Phosphatpuffer bei physiologischem pH-Wert gewaschen, dabei war eine Elution des IgG vom FcRn zu beobachten.

Der Versuch wurde mehrfach mit verschiedenen Konzentration IgG in der mobilen Phase wiederholt, wobei Bindungskurven mit IgG Konzentrationen zwischen zwanzig und hundert  $\mu\text{g/mL}$  erzeugt (s. h. Abb. 7.43 im Anhang) und als geeignet für die Berechnung einer Assoziations- und Dissoziationskonstante befunden wurden.

Die dabei bestimmten Werte wurden mit einer  $k_a$  und einer  $k_d$  (vgl. Tab.: 3.2 und Tab.: 3.3) aus der Literatur verglichen (Raghavan M. 1995).

Zur Untersuchung der Bindung zwischen dem FcRn und Albumin war es notwendig, die Bindestelle am FcRn auf Funktion zu testen, da für die Bindung an Albumin eine andere Domäne verantwortlich ist als für die Bindung an IgG. Nach Literaturangaben (Chaudhury C. 2006) sind sogar Bindungskomplexe aus den drei Proteinen FcRn, Albumin und IgG möglich.

Der Funktionstest erfolgte mit humanem Serum Albumin in HEPES Puffer bei pH 5,5 in der mobilen Phase und dem am *chip* kovalent gebundenen FcRn. Dabei wurde HSA in Konzentrationen zwischen zwei  $\mu\text{g/mL}$  und zwei  $\text{mg/mL}$  eingesetzt und eine Kurvenschar detektiert (s. h. Abb. 3.40).

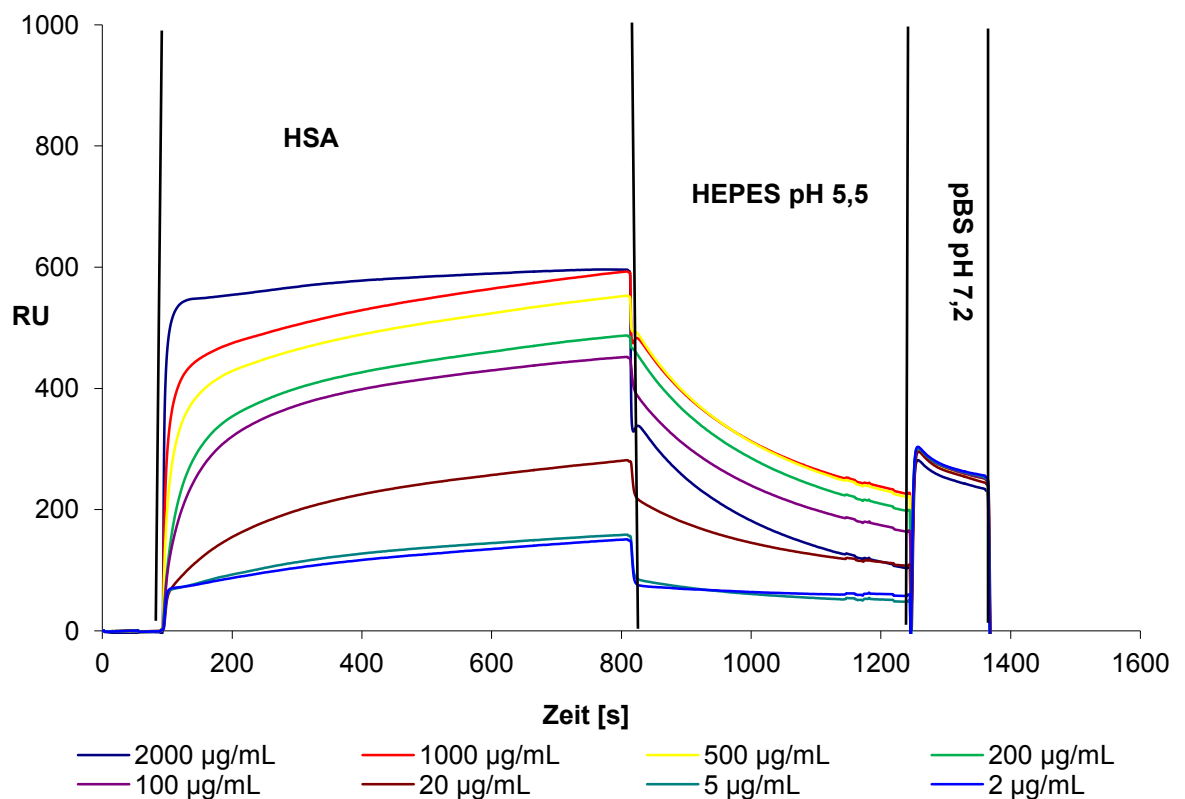


Abb. 3.40:

HSA in mobiler Phase, FcRn in der Festphase

Der Bindungstest wurde auf Reproduzierbarkeit überprüft und die dabei generierten Ergebnisse wurden mit Literaturangaben verglichen.

Zur Berechnung einer Assoziations- und Dissoziationskonstante wurden HSA Konzentrationen von 100, 200, und 500  $\mu\text{g/mL}$  eingesetzt (s. h. Abb. 7.44. im Anhang). Die dabei berechneten Werte wurden mit Literaturangaben verglichen (vgl. Tab.: 3.2 und Tab.: 3.3) (Chaudhury C., 2006 und Raghavan M., 1995).

Tab.: 3.2: Übersicht  $k_a$  Werte IgG und HSA aus Literatur (Raghavan M., 1995 ; Chaudhury C., 2006) und eigene Messung

Assoziationskonstanten	Literatur Angabe	eigene Messung
IgG $k_a$ [ $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ]	$1,8 \text{ E}10^5$	$3,4 \text{ E}10^5$
HSA $k_a$ [ $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ]	$9,3 \text{ E}10^3$	$4,3 \text{ E}10^3$

Tab.: 3.3: Übersicht  $k_d$  Werte IgG und HSA aus Literatur und eigene Messung

Dissoziationskonstanten	Literatur Angabe	eigene Messung
IgG $k_d$ [ $s^{-1}$ ]	$3,6 \cdot 10^{-3}$	$4,2 \cdot 10^{-3}$
HSA $k_d$ [ $s^{-1}$ ]	$7,8 \cdot 10^{-3}$	$5,6 \cdot 10^{-3}$

### 3.5.4 Referenz für Albuminmutanten an FcRn und umgekehrt

Zur Überprüfung der Bindung zwischen FcRn und Albumin wurden Bindungen untersucht, bei denen der FcRn an den *chip* kovalent gebunden war und sich Albumin in der mobilen Phase befand, wie auch umgekehrt.

Der Versuch diente zum Einen zur Findung der optimalen Versuchsbedingungen für einen Bindungsvergleich zwischen den verschiedenen Albuminvarianten zum FcRn, zum Anderen konnte durch diesen Versuchsaufbau ausgeschlossen werden, dass die erstellten Bindungskinetiken nicht übermäßig durch Fremdprotein oder andere Artefakte und Verunreinigungen von Proben verfälscht worden sind.

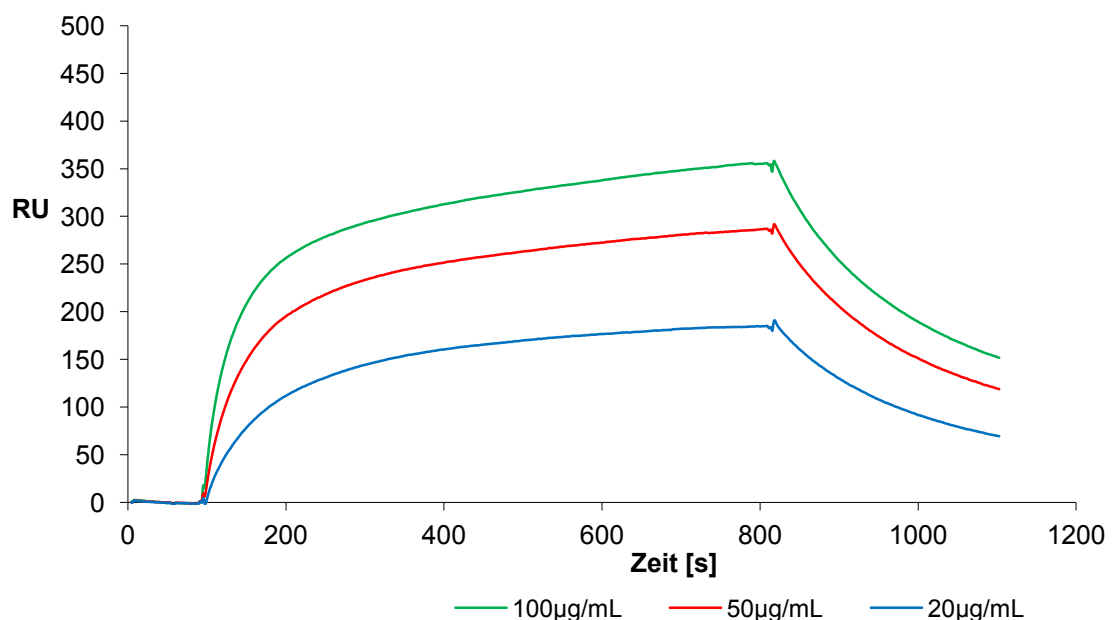
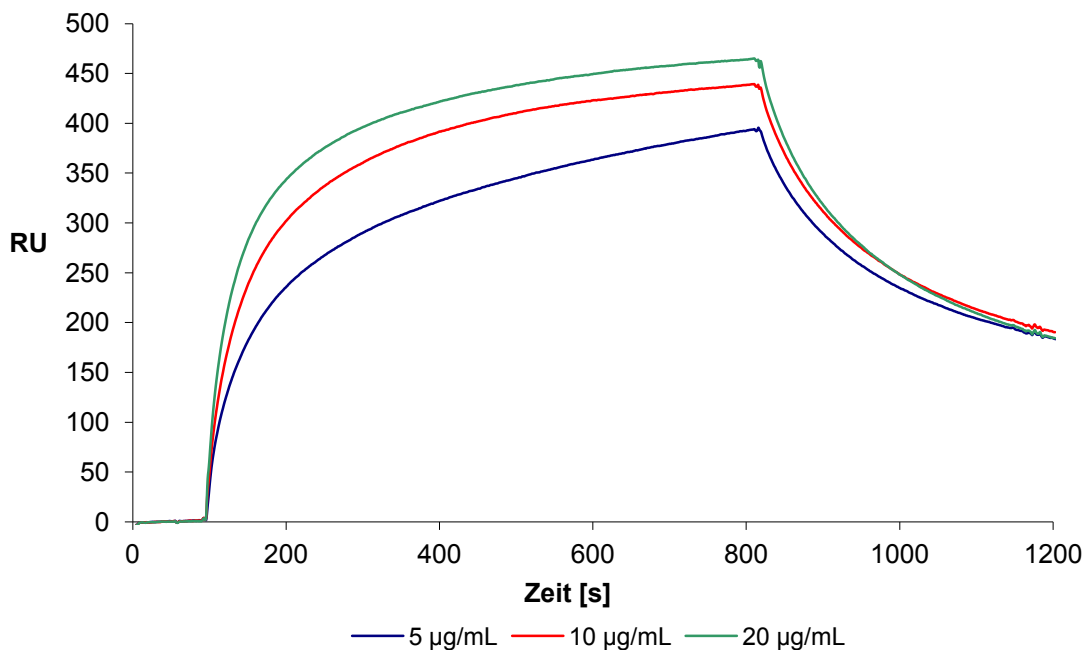


Abb. 3.41:  
rHA-wt in mobiler Phase, FcRn in der Festphase

**Abb. 3.42:****FcRn in mobiler Phase, rHA-wt in der Festphase**

Beim Vergleich der Bindungskurven zwischen denen von Albumin in der mobilen Phase (Abb. 3.41) und denen vom FcRn in der mobilen Phase (Abb. 3.42) fällt auf, dass der letztere genannte Versuchsaufbau bei einer um den Faktor fünf geringeren Proteinkonzentration von FcRn in der mobilen Phase eine vergleichbare Bindungskurve erzeugt wie eine entsprechend höher eingesetzte Albuminkonzentration in der mobilen Phase.

Die Ursache für diesen Unterschied von einem Faktor fünf in der Konzentration der Probe bei gleicher Änderung der Schichtdicke ist nicht durch die geringe Differenz der molaren Massen von 66 kDa für Albumin zu 52 kDa für den FcRn zu erklären. Vielmehr ist entweder eine exponiertere Präsentation der Bindestelle am Albumin während dessen N-terminaler Immobilisierung gegeben oder umgekehrt eine schlechter exponierte Bindestelle am FcRn während dessen N-terminaler Immobilisierung.

Eine weitere Erklärung für eine höhere Schichtdicke bei gleicher Konzentration könnte das Vorhandensein mehrerer Bindestellen am immobilisierten Albumin zum FcRn sein, mit der Folge einer Bindung mehrerer FcRn Moleküle an ein Albumin Molekül und an einer damit verbundenen stärkeren Änderung der Schichtdicke. Diese stärkere

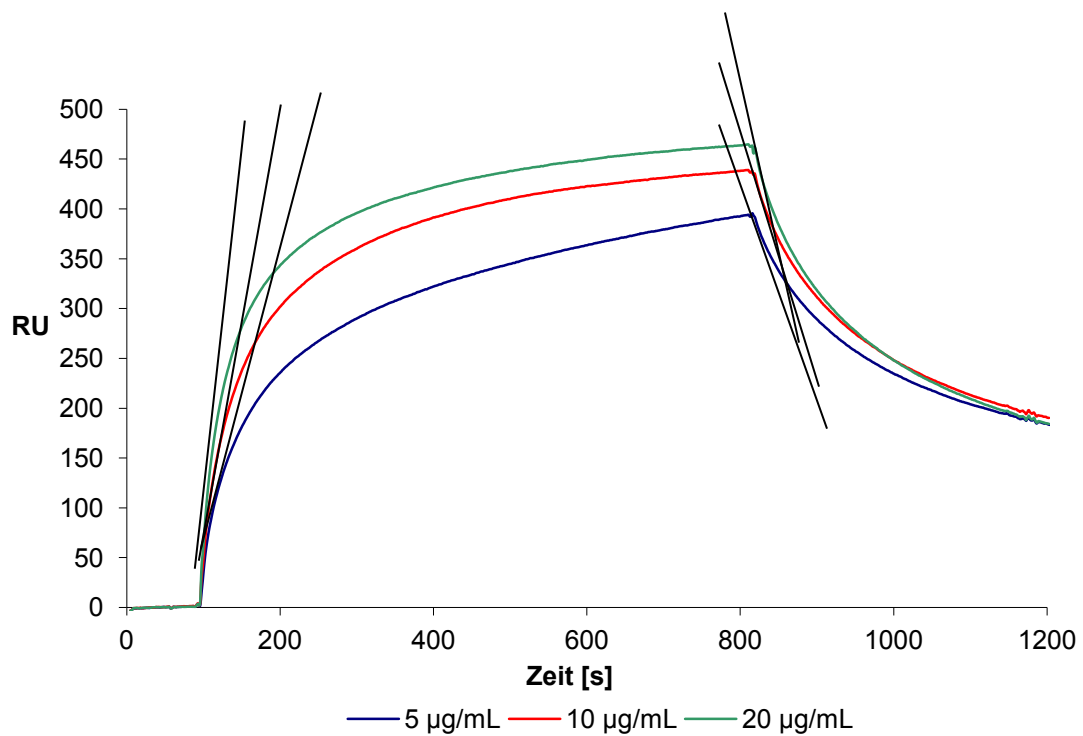
Änderung der Schichtdicke wäre im umgekehrten Versuchsaufbau nicht möglich, da die Menge der immobilisierten FcRn Moleküle konstant ist und der FcRn nur eine Bindestelle zu Albumin hat (Andersen JT., 2008).

Eine weitere Ursache für die geringere Änderung der Schichtdicke, während sich Albumin in der mobilen Phase befindet, könnten Albuminfragmente oder denaturierte Proteine sein, welche unspezifisch und irreversibel an den FcRn oder an die Matrix des *chips* binden und damit potentielle Bindesstellen an dem immobilisierten FcRn überdecken. Ein schlechteres Regenerationsverhalten des *chips* nach einem erfolgten Lauf durch milde Regenerationsmittel, wie der hier verwendete Phosphatpuffer physiologischen pH Wertes, belegen die Annahme.

Auf Grund der geringeren eingesetzten Menge an Protein und der verbesserten Regenerierbarkeit des *Chips* wurde bei sämtlichen Bestimmungen der Bindungskinetiken der Versuchsaufbau gewählt, Albumine zu immobilisieren und den FcRn in der mobilen Phase einzusetzen.

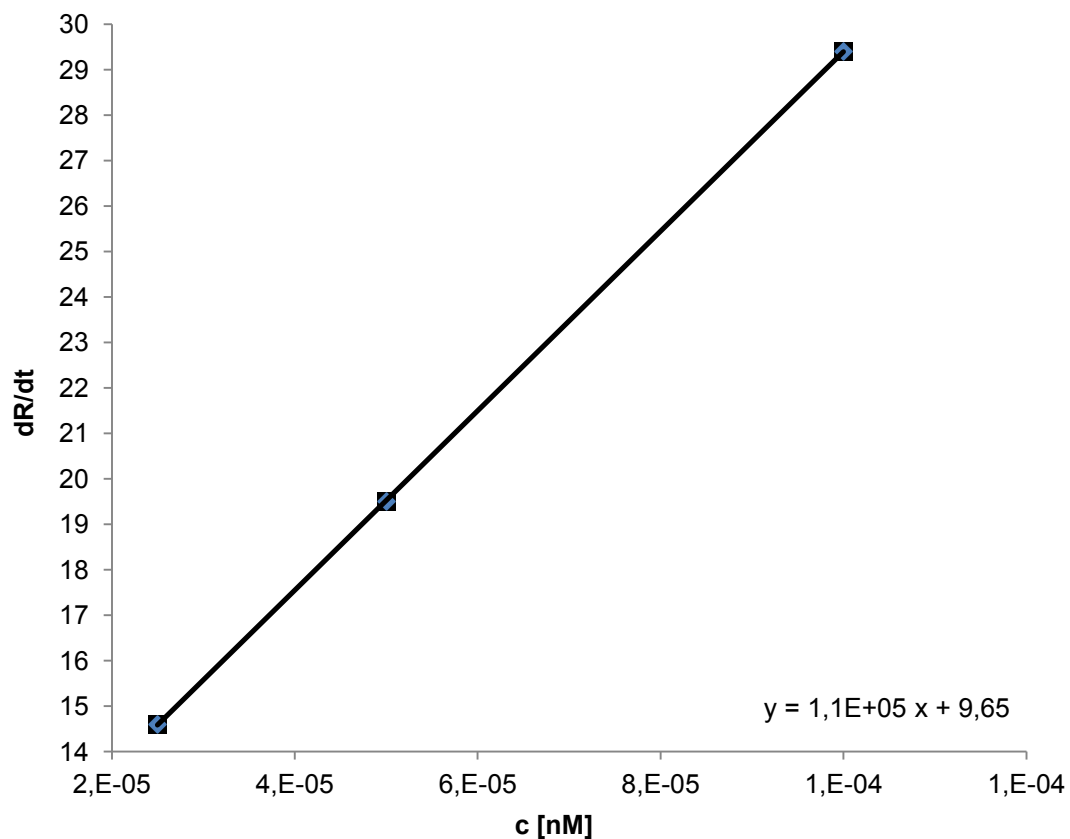
#### **3.5.4.1 Erstellung von Bindungskinetiken am Beispiel Albumin Wildtyp**

Zur Berechnung der  $k_a$  und  $k_d$  Werte wurde die zu bestimmende Albuminvariante an den Dextranfäden des *Chips* immobilisiert (vgl. Kap.7.9.2). Der FcRn wurde in der mobilen Phase eingesetzt, dabei wurden die Konzentrationen dessen entsprechend eines exponentiellen Kurvenverlaufs gewählt. Der mit Albumin beschichtete *chip* wurde so lange mit FcRn angeströmt, bis dieser an sämtliche potentielle Liganden gebunden hatte und die Schichtdicke somit nicht mehr zunehmen konnte, was sich in dem in Abb. 3.43 dargestellten Diagramm als Plateau der Bindungskurven widerspiegelt. An die ansteigenden Sättigungskurven wurden Tangenten angelegt und deren Steigung bestimmt. Nach Erreichen des Plateaus wurde der *chip* mit dem Laufpuffer der mobilen Phase angeströmt, bis sämtlicher FcRn dissoziiert war, was anhand des in Abb. 3.43 dargestellten Diagramms als Plateau der Dissoziationskurven dargestellt ist. Die Dissoziationsphase ist auf dem Graphen anhand der größten negativen Steigung zu erkennen; in diesem Bereich wurden Tangenten angelegt und deren Steigung bestimmt.

**Abb. 3.43:**

**FcRn in mobiler Phase, rHA-wt in der Festphase, angelegte Tangenten zur Berechnung von  $k_a$  und  $k_d$  eingezeichnet**

Die Berechnung der Assoziationskonstante erfolgte nach Gleichung 2.5 (vgl. Kap.: 2.5.1.3). Dabei wurden die Tangentensteigungen der Assoziationsphase gegen deren jeweilige molare Konzentrationen aufgetragen (Abb. 3.44). Die Steigung der daraus resultierenden Geraden entspricht der Assoziationskonstanten von  $1,1E5$  für FcRn an rHA.



**Abb. 3.44:**

**Berechnung, des  $k_s$ -Wertes, aufgetragen: die Steigungen der Assoziationsphasen gegen die Konzentrationen der jeweiligen aufgetragenen Proben**

Die Berechnung der Dissoziationskonstanten erfolgte nach Gleichung 2.6 (vgl. Kap.: 2.5.1.3).

Dazu wurden die natürlichen Logarithmen der Quotienten aus der initialen Response und relativen Responses im Bereich der Dissoziation gegen deren Zeitpunkte der Detektion aufgetragen. Deren Tangentensteigungen entsprechen den Dissoziationskonstanten ( $k_d$ ). Für eine Bindungsmessung vom FcRn an immobilisiertes rHA wurde eine Dissoziationskonstante von  $1,14 \cdot 10^{-2}$  berechnet.



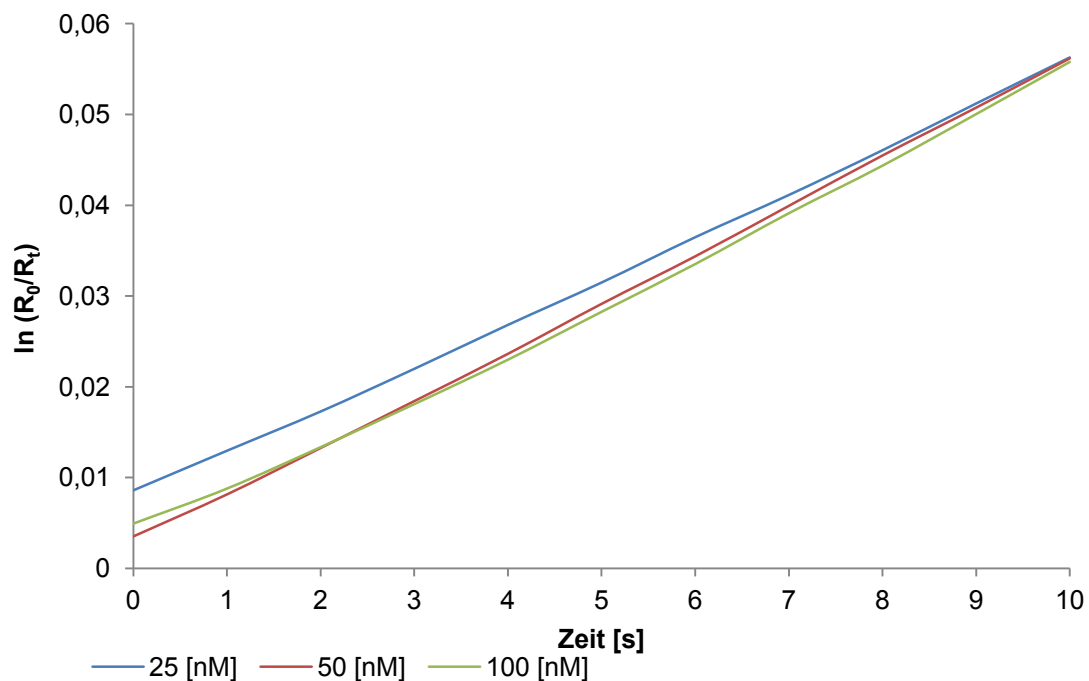


Abb. 3.45:

Zur Berechnung der  $k_d$ -Werte, aufgetragen: der  $\ln$  aus dem Quotienten von  $R_0$  und  $R_t$  gegen die Zeit

Aus den berechneten Assoziations- und Dissoziationskonstanten wurde die Affinitätskonstante  $K_A$  und deren Kehrwert  $K_D$  anhand von Gleichung 2.2 bzw. 2.3 berechnet.

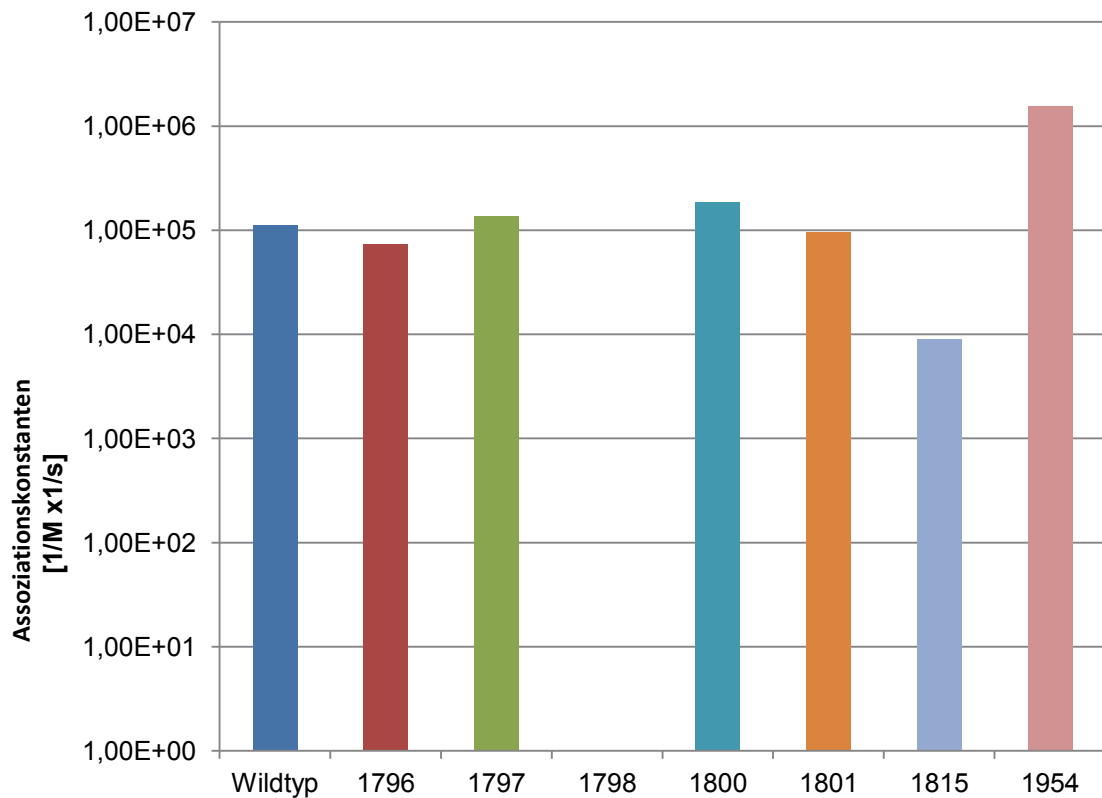
Die hier am Bsp. des rHA Wildyps dargestellte Berechnung der Kinetiken wurde für alle hergestellten Albuminmutanten entsprechend durchgeführt; eine Übersicht über die dabei bestimmten Konstanten sind im Anhang in Tab.: 7.3 dargestellt.

### 3.5.5 Erstellung von Bindungskinetiken alanisierter rekombinanter Albumine

Zur Untersuchung der Bindestelle von FcRn und Albumin wurden zunächst acht Albuminvarianten hergestellt, bei jeder wurde ein anderer Bereich von einigen Aminosäuren durch Alanine ersetzt. (vgl. Kap.: 3.1.1)

Nachdem von diesen Abbaukinetiken in der Ratte erstellt worden waren (vgl. Kap.:3.4.1) wurde die Bindung zu einem rekombinanten humanen FcRn durch SPR

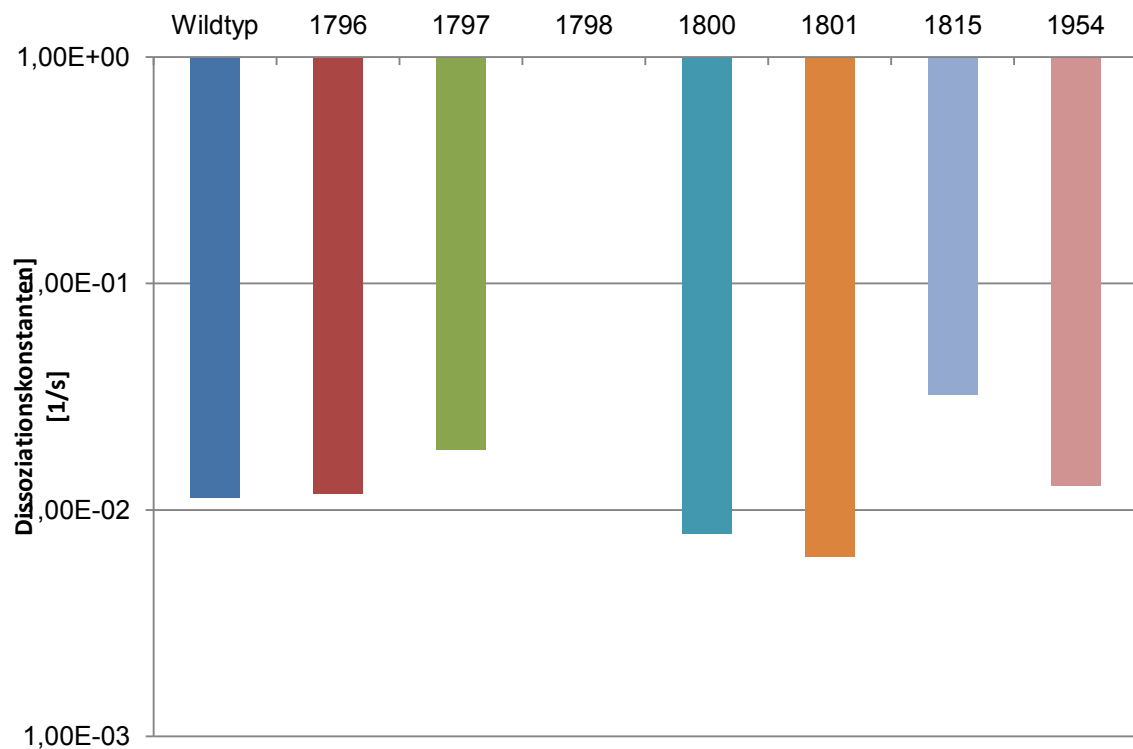
bestimmt. Die dabei berechneten Assoziationskonstanten und Dissoziationskonstanten sind in einer Übersicht graphisch dargestellt (Abb. 3.46 und Abb. 3.47).



**Abb. 3.46:**  
Übersicht über die bestimmten  $k_a$ -Werte alanisierter Albumine

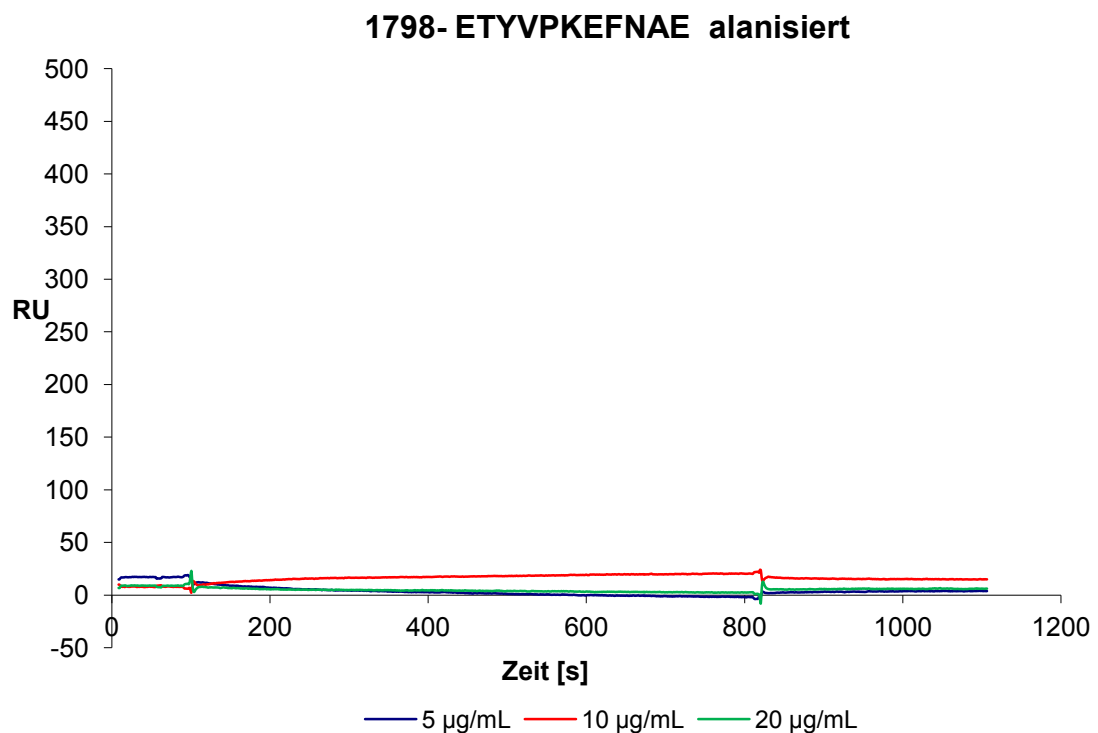
Die Assoziationskonstanten der Albuminmutanten 1796, 1797, 1800, 1801 liegen im Bereich zwischen  $7,24 \times 10^4$  und  $1,83 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , während die von Klon 1685 rHA Wildtyp bei  $1,12 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  liegt. Das entspricht max. 3,7 % mehr und max 4,2% weniger bezogen auf den Wildtyp Albumin. Diese Albuminklone weisen in der Assoziation offenbar keinen signifikanten Unterschied in Ihrem Bindungsverhalten zum FcRn auf. Die Bindungskurven sind der des Wildtyps ebenfalls sehr ähnlich. (vgl. Anhang: Abb. 7.45, bis Abb. 7.48)

Auffällig hingegen ist, dass Klon 1798 nicht an FcRn bindet, der Klon 1815 mit  $2,69 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  21,7% schwächer an FcRn bindet als der Wildtyp und der Klon 1954 mit  $1,55 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  22,5% stärker als der Wildtyp an FcRn bindet.

**Abb. 3.47:****Übersicht über die bestimmten  $k_d$ -Werte alanisierter Albumine**

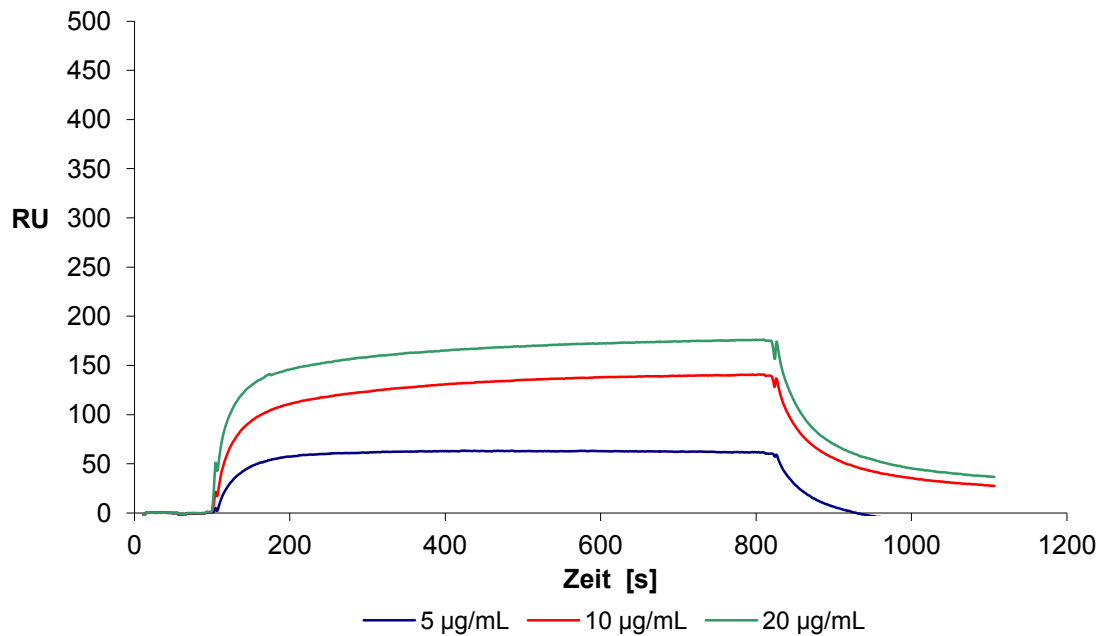
Die Dissoziationskonstanten der Albuminmutanten 1796 und 1954 unterscheiden sich von der des Wildtyps nur um 0,7% und 2,7%, die der Albuminmutanten 1797, 1800, 1801 dagegen um 10,8%, 8,25% und 13,4%. Beim Albuminklon 1815 dagegen findet eine sehr geringe Dissoziation statt, sie ist 23% geringer als die des Wildtyps.

Auffällige Bindungskurven im Vergleich zu Wildtyp Albumin zeigten die Graphen der Albuminvarianten 1798, 1815 und 1954.

**Abb. 3.48:**

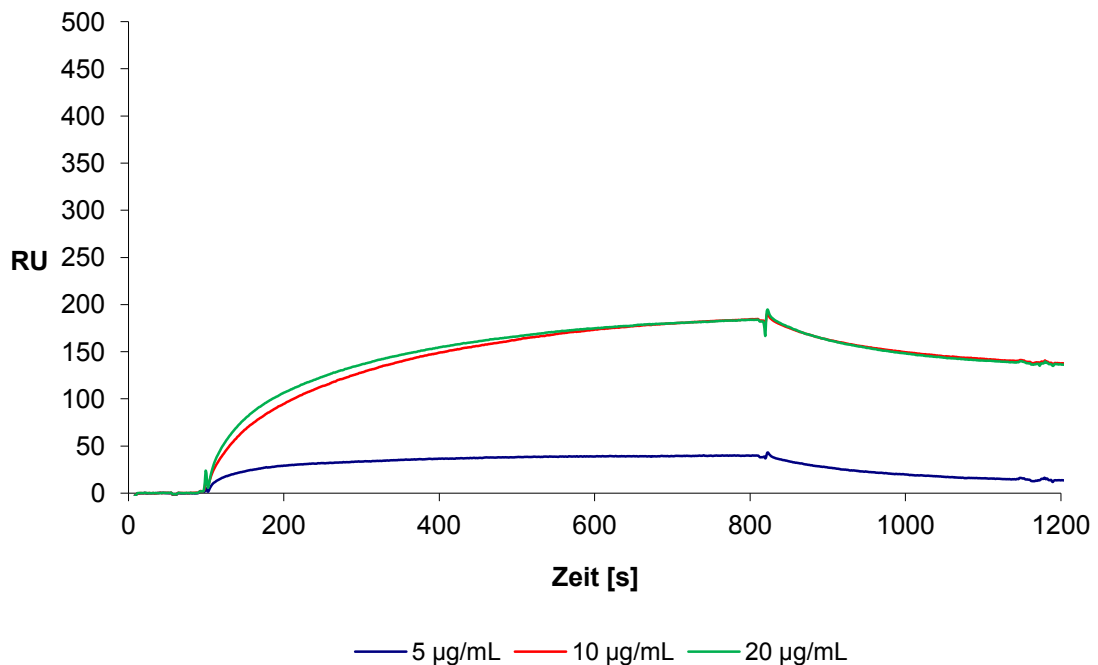
**FcRn in mobiler Phase, Albuminvariante 1798 in der Festphase, keine Bindung zu erkennen**

Der Graph der Albuminvariante 1798 zeigt über die Assoziations- und Dissoziationsphase einen linearen flachen Verlauf von max. 20 RU. Nach 100 und 810 sec. sind kleine Ausschläge bedingt durch Puffersprünge zu erkennen. Der Graph zeigt aber in keinsten Weise Charakteristika einer Bindungskinetik. Wenn man also im Albumin die Aminosäuresequenz ETYVPKEFNAE durch Alanine ersetzt, ist durch SPR Technik keine Bindung an den FcRn mehr meßbar.

**1954-KATKE alanisiert****Abb. 3.49:****FcRn in mobiler Phase, Albuminvariante 1954 in der Festphase**

Der Graph der Albuminvariante 1954 zeigt einen sehr steilen Verlauf während der Assoziationsphase, deutlich steiler als beim Albumin Wildtyp. Auch das Plateau wird schon zu einem früheren Zeitpunkt erreicht. Die Dissoziationsphase verläuft dagegen nahezu identisch mit dem Wildtyp Albumin, was auch den nur marginalen Unterschied in deren Dissoziationskonstanten von nur 2,7% verdeutlicht. Die maximale *response* im Graph von Klon 1954 liegt nur bei ungefähr einem Drittel gegenüber dem Wildtyp Albumin, was durch eine geringere Immobilisierung des Albuminklons 1954 zu erklären ist.

Eine Alanisierung von Albumin im Bereich der Aminosäuresequenz KATKE bewirkt im Hinblick auf die Bindung zum FcRn eine Erhöhung der Assoziationskonstante um 27%, bei einer nahezu identischen Dissoziationskonstante in Relation zum Wildtyp Albumin.

**1815-KADDKET +T539 alanisiert****Abb. 3.50:**

**FcRn in mobiler Phase, Albuminvariante 1815 in der Festphase, Bindung schwächer als wt-rHA**

Der Graph der Albuminvariante 1815 zeigt einen relativ flachen Verlauf während der Assoziationsphase, die Assoziationskonstante liegt um 21% unter der von Wildtyp Albumin. Das Plateau wird erst nach 800 sec. Assoziation erreicht, deutlich später als beim Wildtyp. Die Dissoziationsphase verläuft ebenfalls erheblich flacher, die Dissoziationskonstante liegt entsprechend um 23% höher als die des Wildtyps. Ein erheblicher Teil des Analyten dissoziiert nicht durch Waschen mit dem Laufpuffer, sondern erst während der Regeneration.

Die Alanisierung der Aminosäuresequenz KADDKET und des Threonins 515 wie in Klon 1815 durchgeführt, bewirken eine deutlich schwächere Assoziation und eine schwächere Dissoziation. Bemerkenswert ist der Unterschied verglichen mit dem Klon 1800 (vgl. Abb. 7.47), dessen Bindungskurve mit der des Wildtyp Albumins ähnlich ist, wobei der Unterschied der Klone 1800 und 1815 nur in der zusätzlichen Alanisierung der AS Threonin an der Stelle 515 liegt.

### 3.5.6 Erstellung von Bindungskinetiken punktmutierter rekombinanter Albumine

Zur Identifizierung der Bindestelle von FcRn und Albumin wurden in einem weiteren Schritt punktmutierte Albumine hergestellt. Die Punktmutationen fanden in Sequenzbereichen der zuvor während der Abbaukinetiken in der Ratte und den SPR Messungen aufgefallenen alaninisierten Sequenzen im Albumin statt. (vgl. Kap.: 3.1.2, 3.4.1 und 3.5.5) Dabei wurden Bindungskinetiken über fünf punktmutierte Albumine im Bereich der AS KATKE erstellt und eine Punktmutation im Bereich ETYVPKEFNAE erstellt.

Die dabei berechneten Assoziationskonstanten und Dissoziationskonstanten, sowie die Gleichgewichtskonstanten der Assoziation und der Dissoziation sind in Übersichtsdiagrammen im Anhang graphisch dargestellt (s.h.: Abb. 7.52, Abb. 7.53, Abb. 7.54 und Abb. 7.55)

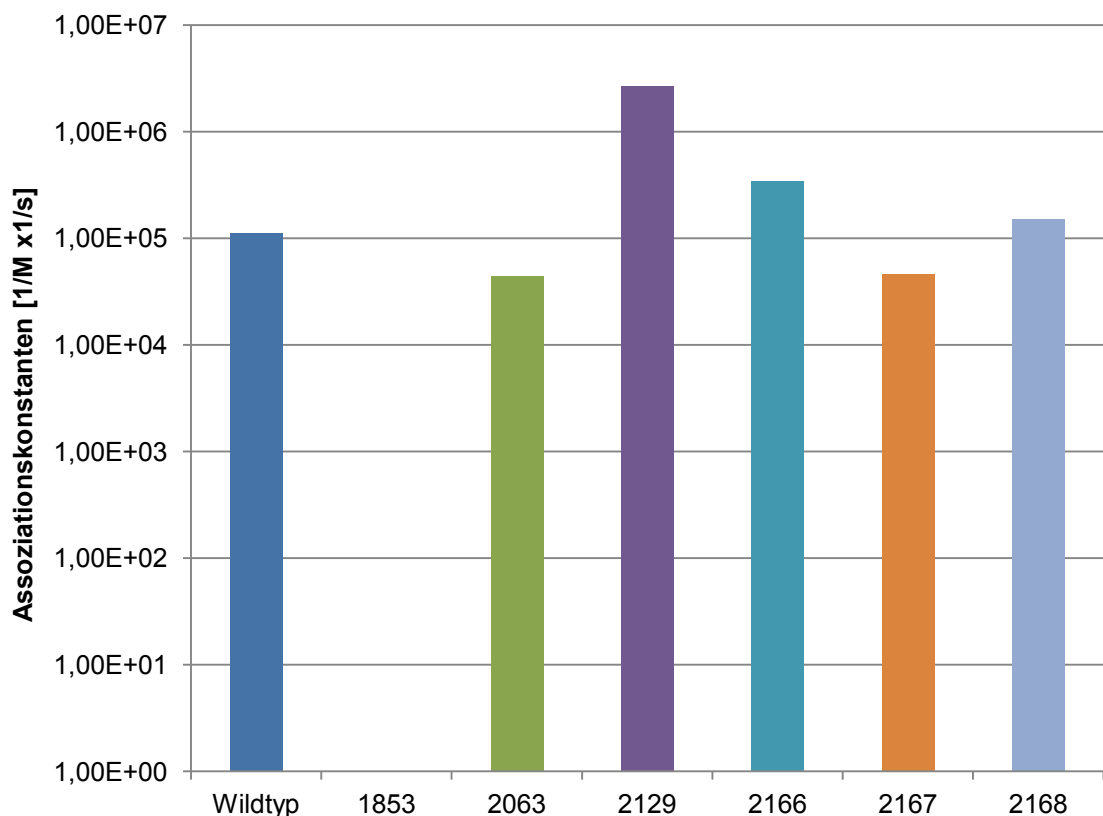
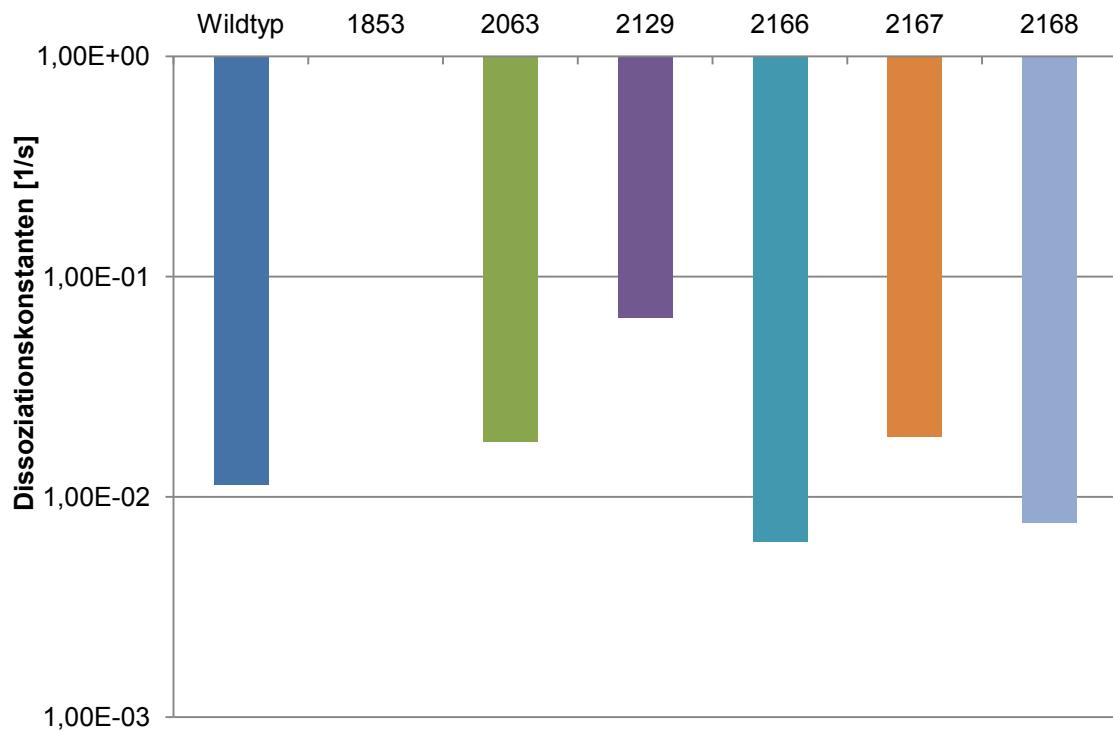


Abb. 3.51:

Übersicht über die bestimmten  $k_a$ -Werte punktmutierter Albumine

Die Assoziationskonstanten der punktmutierten Albumine 2063, 2166, 2167 und 2168 weichen vom Wildtyp Albumin weniger als 10 % ab. Die Punktmutante 1853 zeigt keine Bindung. Dagegen zeigt die Punktmutante 2129 eine um 27% erhöhte Affinität gegenüber dem Wildtyp.



**Abb. 3.52:**

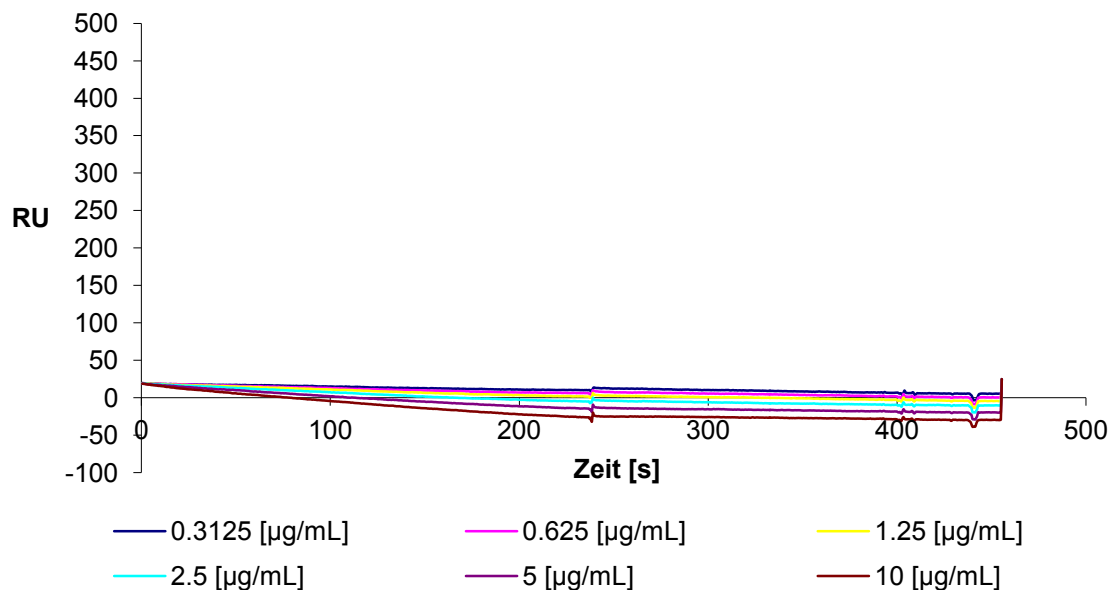
**Übersicht über die bestimmten  $k_d$ -Werte punktmutierter Albumine**

Die vier punktmutierten Albumine 2063, 2166, 2167 und 2168, welche vom Wildtyp weniger als 10 % in der Assoziation abweichen, weichen in der Dissoziation zwischen 8% und 13% vom Wildtyp ab. Sie zeigen damit keine besonders starken Auffälligkeiten in ihrem Bindungsverhalten zum rekombinanten humanen FcRn.

Besonders auffällig ist die nicht vorhandene Bindung des Albuminklons 1853, obwohl hier nur 2 Lysine alanisiert wurden. Aus dem Graph ist keine Bindung ersichtlich.

Die Punktmutation 2129 dagegen zeigt nach der Alanisierung eines einzigen Lysins eine deutliche erhöhte Affinität, deren Dissoziationskonstante um 38% höher liegt als die des Wildtyp Albumins.

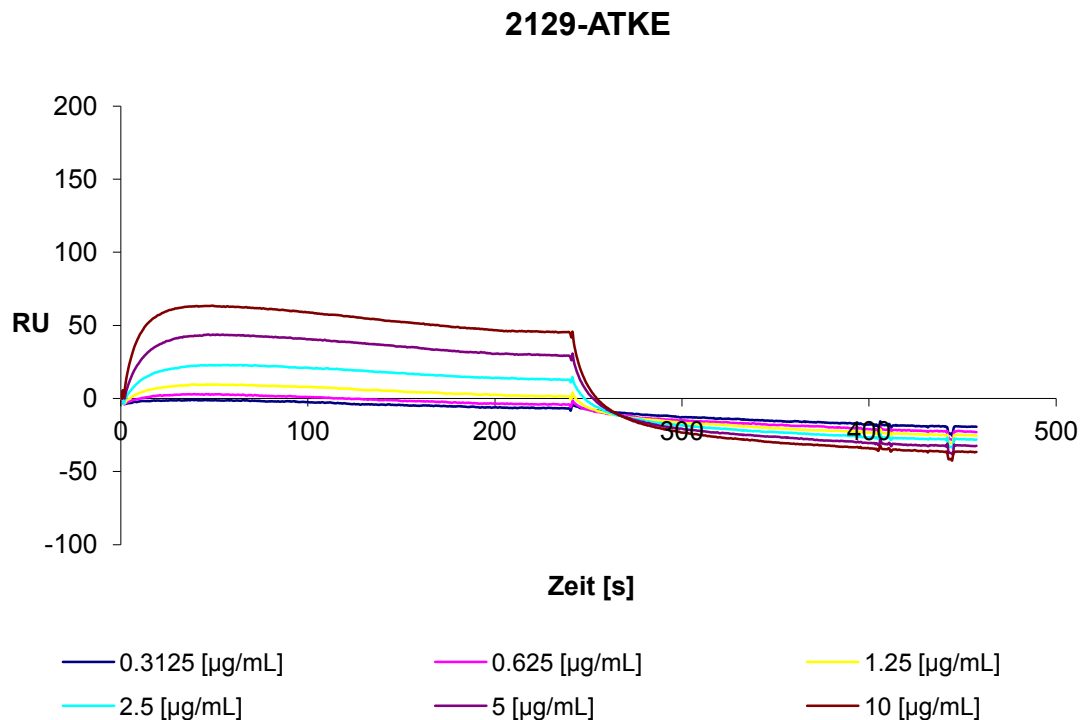


**1853- ATYVPKEFNAA****Abb. 3.53:**

**FcRn in mobiler Phase, Albuminvariante 1853 in der Festphase, keine Bindung zu erkennen**

Bei der Albuminvariante 1853 wurde das erste und letzte Glutaminsäure aus der Aminosäuresequenz ETYVPKEFNAE analysiert, um die nicht vorhandene Bindung an der alaninisierten Sequenz beim Klon 1798 zu überprüfen und zu spezifizieren.

Der Graph zeigt keine Anzeichen einer Bindungskinetik, allerdings ist ein abfallendes Signal insbesondere während der Assoziationsphase zu erkennen. Der Abfall des Signals entspricht weniger als 20 RU und ist daher nicht signifikant für die Messung. Dies könnte durch eine Auswaschung des Liganden bedingt sein. Eine unzureichende Absättigung der Referenzzelle durch Ethanolamin und damit verbundene unspezifische Wechselwirkungen des Analyten FcRn ist als Ursache für ein abfallendes Signal der Referenzkurve auszuschließen. Dieser Vorgang erfolgte für alle Albumine gleich.



**Abb. 3.54:**

**FcRn in mobiler Phase, Albuminvariante 2129 in der Festphase, Bindung schwächer als wt-rHA**

Bei der Albuminvariante 2129 wurde das erste Lysin der Aminosäuresequenz KATKE alanisiert. Diese Punktmutation führte zu einer um 27% höheren Affinitätskonstante verglichen mit dem Wildtyp, die Dissoziation erfolgte ebenfalls um 38% langsamer als beim Wildtyp. Allerdings ist die Response von FcRn am Liganden Albumin 2129 generell nicht sehr hoch, obwohl eine mit dem Wildtyp vergleichbare Menge Albumin auf dem Chip immobilisiert wurde. Die Schmelzkurve der Albuminvariante 2129 weist auf eine Faltung hin, die nicht dem Albumin Wildtyp entspricht. Da wäre eine Auswaschung des Liganden während der Dissoziationsphase, ein potentieller Grund für das abfallende Signal.

### 3.6 Circular Dichroismus-Spektroskopie

Die CD-Spektroskopie wurde zur Analyse von Albuminmutanten eingesetzt, die eine deutlich kürzere Halbwertszeit in der Ratte aufwiesen oder eine besonders schwache Bindung an den FcRn im SPR Spektrum aufzeigten.

Dabei wurde von jeder auffälligen Albuminvariante und dem Albumin Wildtyp ein CD-Spektrum im Bereich von 190 nm bis 260 nm des ultravioletten Lichtes aufgezeichnet. Weiter wurde eine Schmelzkurve bei einer Wellenlänge von 226 nm aufgezeichnet, einer Wellenlänge, bei der für stark  $\alpha$ helikal gefaltete Proteine ein charakteristisches Minimum auftritt (Greenfield NJ., Methods to Estimate the Confrontation of Proteins and Polypeptides from Circular Dichroism Data 1996).

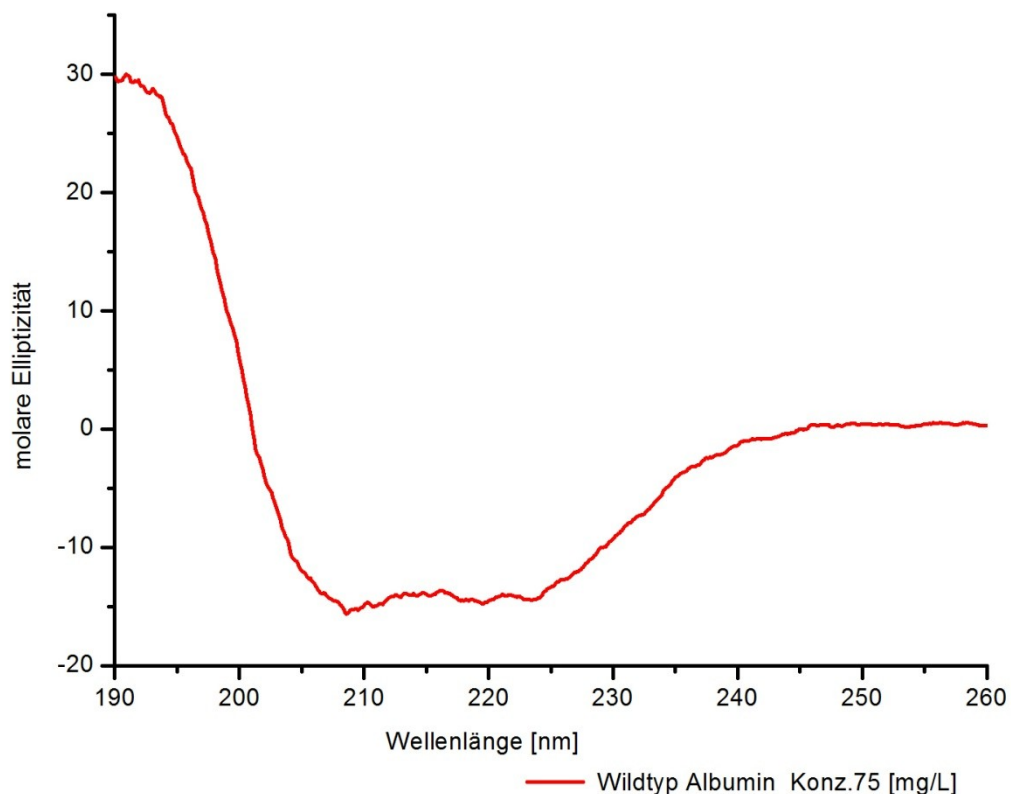
Als Referenz diente das CD Spektrum und die Schmelzkurve des Wildtyp Albumins. Es wurden sowohl CD Spektren, als auch Schmelzkurven von Albuminmutanten mit den Wildtyp Albumins verglichen. Dies diente dazu, Rückschlüsse auf die Ähnlichkeit der Faltungen verglichen mit dem Wildtyp Albumin zu ziehen.

### 3.6.1 CD-Spektren und Schmelzkurven alanisierter Albumine und des Albumin Wildtyps

Die Albuminvarianten 1798, 1954 und 1815 wiesen eine teilweise stark verkürzte Halbwertszeit in der Ratte auf. Im SPR wurde der Albuminklon 1815 durch eine etwas verminderte Affinität zum FcRn auffällig, der Albuminklon 1954 durch eine stark erhöhte Affinität und der Albuminklon 1798 durch überhaupt keine Affinität.

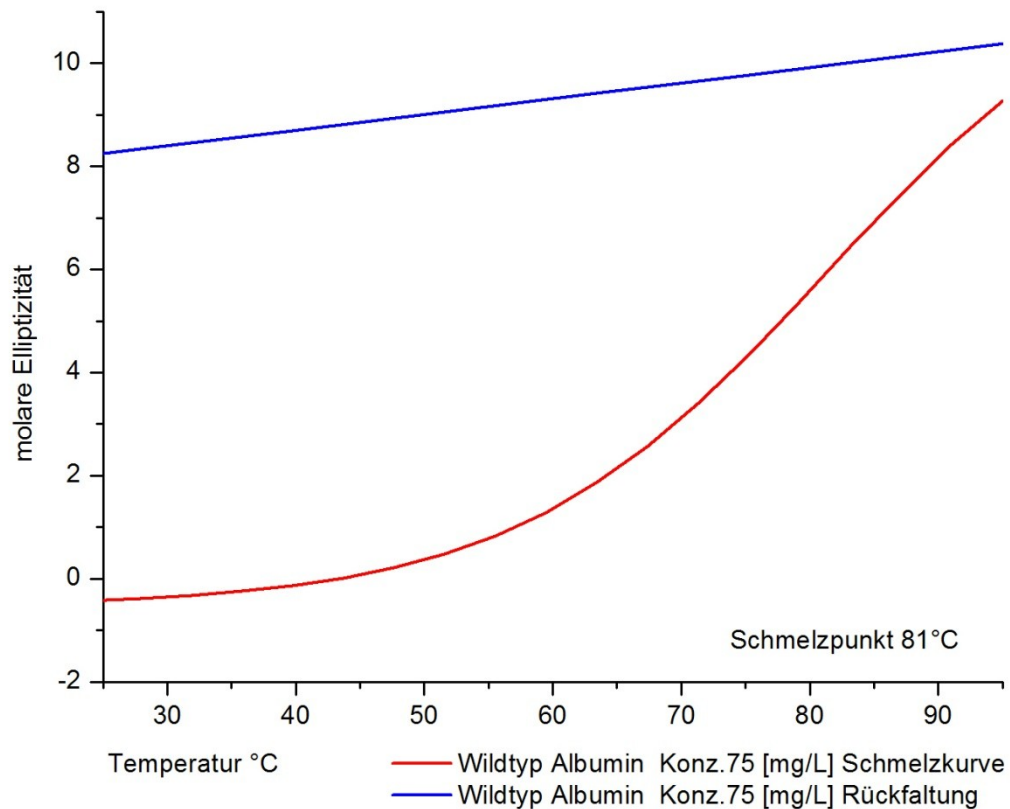
Um Unterschiede in der Sekundärstruktur aufzuzeigen, die für diese unterschiedlichen Eigenschaften verantwortlich sein könnten, wurden diese im Folgenden mit dem Albumin Wildtyp verglichen.

#### 3.6.1.1 CD-Spektrum und Schmelzkurve des Albumin Wildtyps



**Abb. 3.55:** CD-Spektrum des Albumin Wildtyps über die Wellenlängen von 190 bis 260 nm

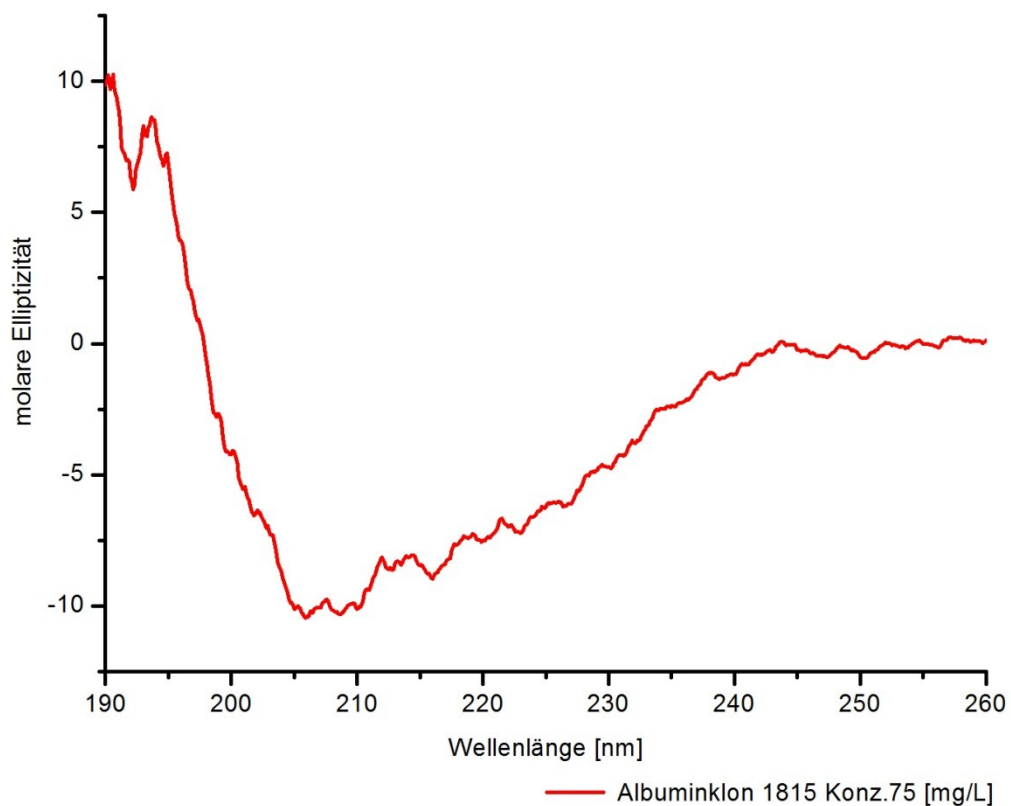
Das CD-Spektrum des Albumin Wildtyps zeigt einen geradezu typischen Verlauf für ein stark alpha-helikal gefaltetes Protein, charakteristisch sind die beiden Minima bei 208 nm und 226 nm und das dazwischen liegende leichte Maximum bei 215 nm.



**Abb. 3.56: Schmelzkuve des Albumin Wildtyps von 25°C bis 95°C**

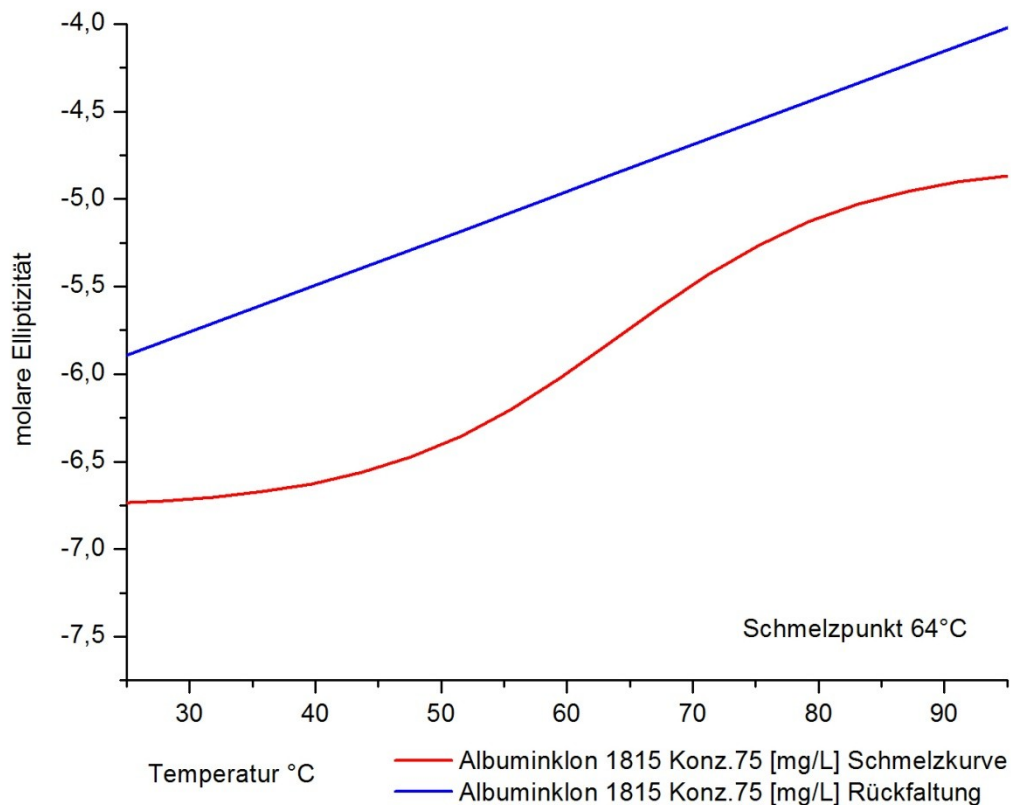
Die Schmelzkurve des Wildtyp Albumins zeigt während des Temperaturanstiegs einen sigmoiden Kurvenverlauf, dessen Wendepunkt bei 81°C dem Schmelzpunkt des Albumins entspricht. Die Entfaltung eines spezifisch gefalteten Proteins erfolgt dabei mit stetig zunehmender Geschwindigkeit, die sich auch bei Temperaturen größer des Schmelzpunktes nur leicht verlangsamt. Eine Rückfaltung in die Ausgangsform ist für Albumin durch eine kontinuierliche Abkühlung von 95°C auf 25°C nicht möglich.

### 3.6.1.1 CD-Spektrum und Schmelzkurve der Albuminvariante 1815



**Abb. 3.57:** CD-Spektrum des Albuminklons 1815 über die Wellenlängen von 190 bis 260 nm

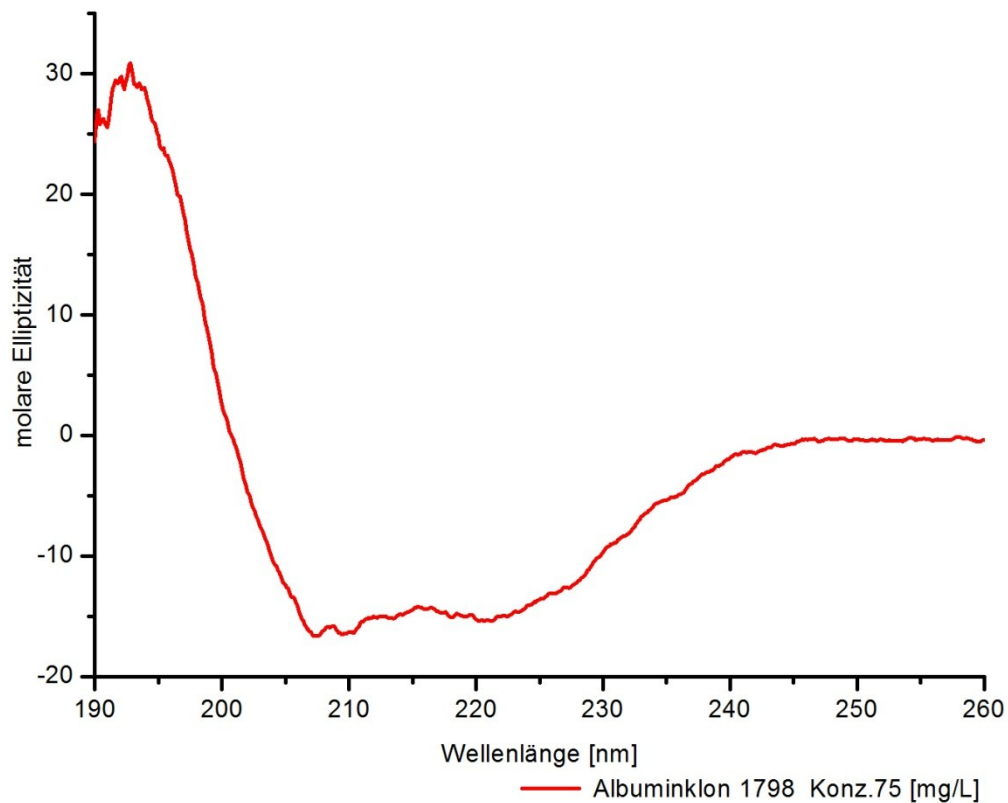
Die Albuminvariante 1815 hatte in der Ratte zwar eine Halbwertszeit ähnlich der des Albumin Wildtyps, jedoch unterschied sie sich durch eine zweistufige Abbaukinetik von allen anderen getesteten Albuminen. Im SPR wies diese eine um 22% geringere Assoziation zum FcRn und eine um 25% geringere Dissoziation als der Wildtyp Albumin auf. Das CD-Spektrum zeigt sehr viele Sprünge in der molaren Elliptizität zwischen den verschiedenen Wellenlängen. Von den für Albumin so charakteristischen Minima ist lediglich das bei 208 nm zu erkennen, das bei 220 nm ist nicht vorhanden.



**Abb. 3.58: Schmelzkurve der Albuminvariante 1815**

Die Schmelzkurve der Albuminvariante 1815 verläuft während der Erwärmung deutlich flacher als die des Wildtyps, der Wendepunkt der sigmoid verlaufenden Kurve und damit der Schmelzpunkt dieser Albuminvariante liegt mit 64 °C deutlich unter der des Wildtyp Albumins. Die Kurve der Rückfaltung durch Abkühlen verläuft dagegen wie beim Wildtyp Albumin strikt linear, die Ausgangsfaltung, welche die Albuminvariante 1815 vor der Denaturierung hatte, wird demnach nicht mehr erreicht. Für eine sich vom Wildtyp Albumin unterscheidende Faltung spricht der sehr viel flachere Verlauf der Schmelzkurve und der sich um 17°C vom Wildtyp unterscheidende Schmelzpunkt. Der Verlauf des CD-Spektrums insbesondere im Bereich der für die Sekundärstrukturerkennung signifikanten Wellenlängen unterscheidet sich stark. Eine vom Wildtyp Albumin abweichende Sekundärstruktur der Albuminvariante 1815 vom Wildtyp ist demnach sehr wahrscheinlich. Dies ist eine mögliche Erklärung für eine zweistufige Abbaukinetik in der Ratte und für das deutlich schlechtere Dissoziationsverhalten.

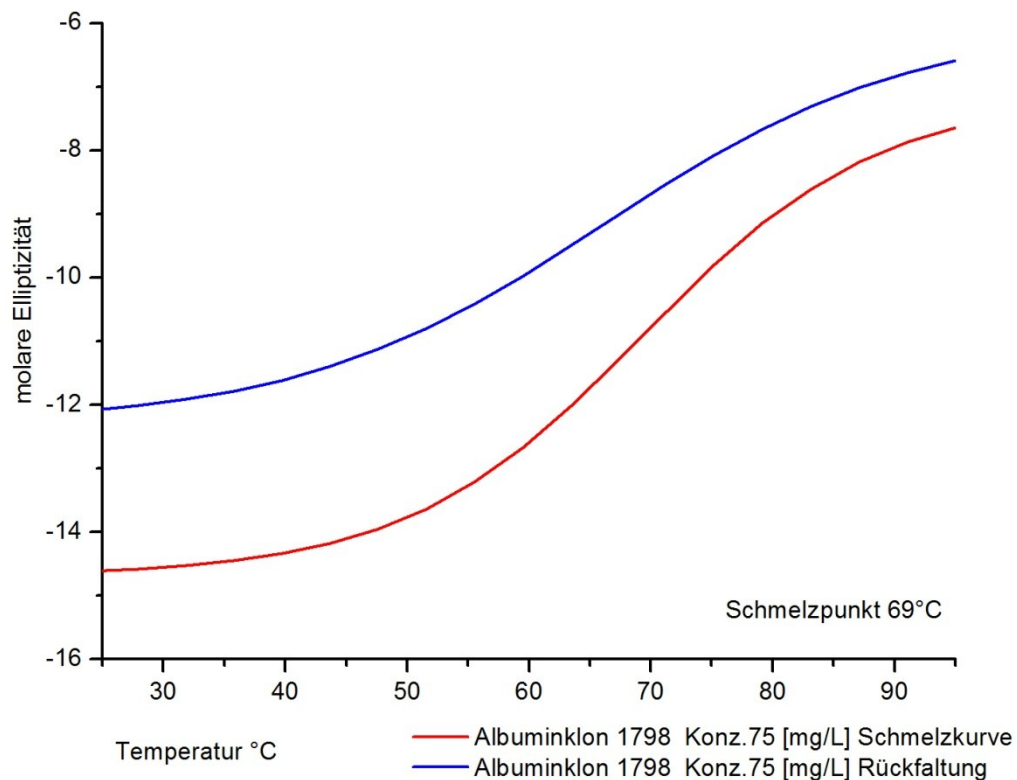
### 3.6.1.2 CD-Spektrum und Schmelzkurve der Albuminvariante 1798



**Abb. 3.59:** CD-Spektrum des Albuminklons 1798 über die Wellenlängen von 190 bis 260 [nm]

Die Albuminvariante 1798 war mit elf alaninisierten Aminosäuren die vom Wildtyp Albumin am stärksten abweichende Albuminvariante. Sie hat in der Ratte eine Halbwertszeit von nur 6,9 Stunden, dies entspricht nur ungefähr der Hälfte der des Wildtyp Albumins. Sie zeigte als einzige Variante während der SPR Messungen keine Bindung zum FcRn. Die hierbei alanisierte Sequenz ist somit am wahrscheinlichsten die für eine Bindestelle zum FcRn, wenn sie auch durch die zahlreichen alaninisierten Aminosäuren für eine vom Albumin Wildtyp abweichende Faltung die gefährdeste ist. Im CD-Spektrum weist sie aber keinen nennenswerten Unterschied zum Referenzspektrum des Wildtyps auf, lediglich bei dem Minimum um 208 nm könnte man eine Abweichung in Form eines doppelten Minimums erkennen.





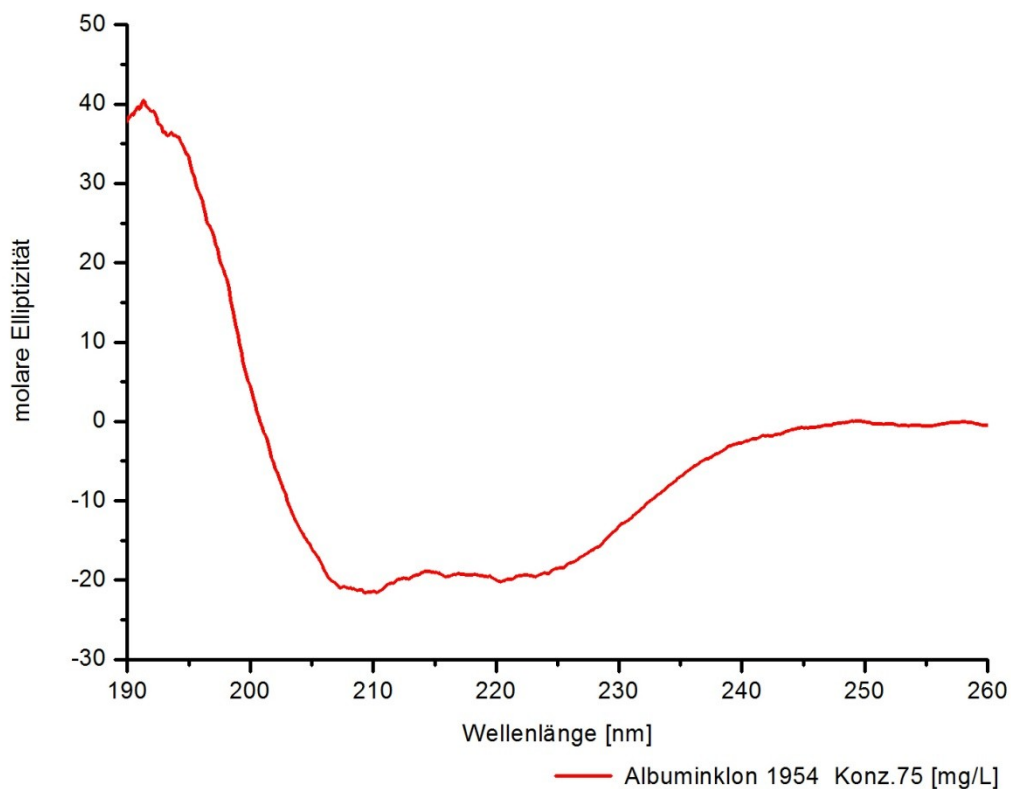
**Abb. 3.60: Schmelzkurve der Albuminvariante 1798**

Die Schmelzkurve des Albuminklons 1798 weist einen typischen sigmoiden Verlauf auf, deren Wendepunkt bei 69°C immerhin 12°C unter dem des Wildtyp Albumins liegt. Während des Abkühlvorgangs von 95°C auf 25 °C weist die Kurve einen deutlich zu erkennenden sigmoiden Verlauf, was ein Hinweis auf die Rückfaltung zu einer Sekundärstruktur ist, die das Protein vor der Denaturierung ursprünglich einmal hatte. Diese entspräche dann aber nicht der des Wildtyp Albumins, demnach ist sehr wahrscheinlich, dass die Albuminvariante 1798 anders gefaltet ist als der Albumin Wildtyp. Allerdings ist die alanisierte Aminosäuresequenz von elf AS sehr lang, so dass eine Alanisierung an der beiden für eine Bindung zum FcRn sehr wahrscheinlichen AS in einem weiteren Schritt vorgenommen wurde insbesondere vor dem Hintergrund der nicht vorhandenen Bindung zum FcRn bedingt durch die hier getätigte Alanisierung.

### 3.6.1.3 CD-Spektrum und Schmelzkurve der Albuminvariante 1954

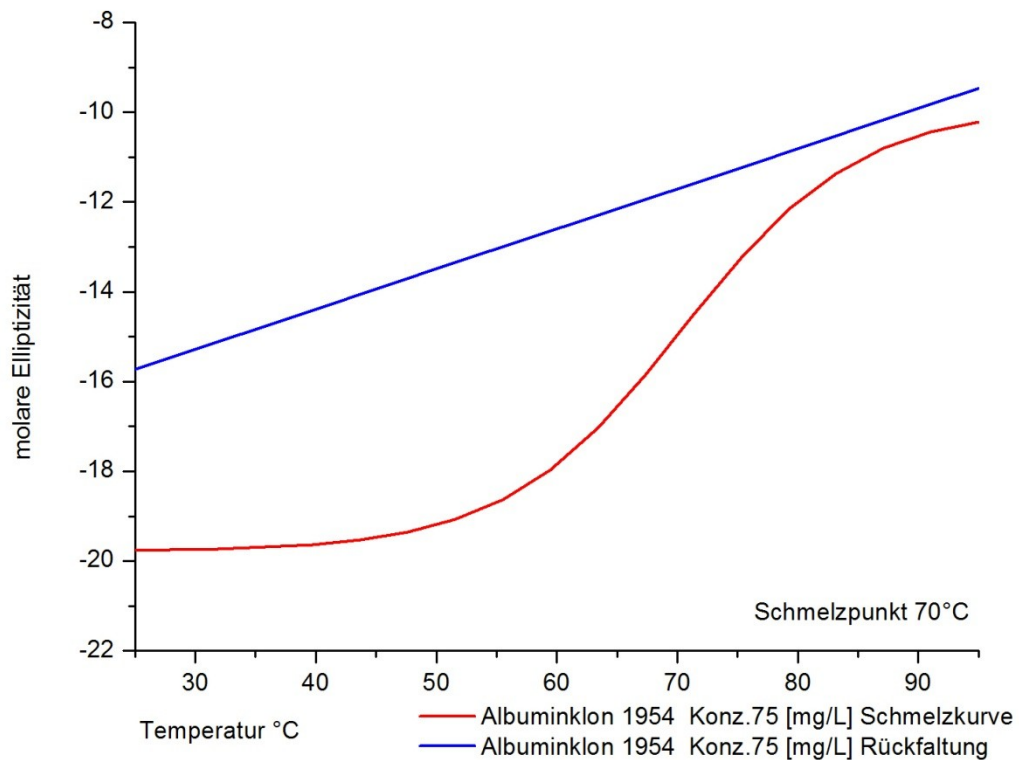
Bei der Albuminvariante 1954 wurden fünf Aminosäuren analysiert, die Halbwertszeit in der Ratte war mit 3,9 Stunden mit Abstand die Kürzeste aller der hier bestimmten Albuminvarianten, und betrug weniger als ein Drittel der des Wildtyp Albumin.

Die Assoziation zum FcRn im SPR ist dagegen 25% stärker als die des Wildtyps, die Dissoziation dagegen verhält sich gleich dem Wildtyp Albumin.



**Abb. 3.61: CD-Spektrum des Albuminklons 1954 über die Wellenlängen von 190 bis 260 nm**

In dem CD-Spektrum ist der Albuminklon 1954 über den gesamten Verlauf dem des Wildtyps identisch, alle Charakteristika, die sich in Minima und Maxima äußern, entsprechen dem Referenzspektrum.



**Abb. 3.62: Schmelzkurve der Albuminvariante 1954**

Die Schmelzkurve dagegen zeigt den zu erwartenden sigmoiden Verlauf mit einem Wendepunkt bei 70°C, der Schmelzpunkt der Albuminvariante 1954 liegt damit 11°C unter dem des Wildtyp Albumins. Die Kurve über die Rückfaltung verläuft dagegen streng linear. Die Mutante erfährt demnach keine gerichtet verlaufende Rückfaltung, woraus zu schließen ist, dass die Faltung vor der Denaturierung eine so spezifische war, dass diese durch Abkühlung nicht wieder zu erreichen ist.

Die Wahrscheinlichkeit einer vom Wildtyp Albumin differierenden Faltung ist damit zwar vorhanden, dennoch ist sie von allen hier untersuchten alaninisierten Albuminvarianten am Geringsten. Die Wahrscheinlichkeit, dass die hier alaninisierten Aminosäuren eine Rolle beim spezifischen Abbau von Albumin in der Ratte haben, ist demnach wahrscheinlich, zumal die um 25% erhöhte Affinität zum FcRn im SPR auch einen beschleunigten Abbau in vivo zur Folge haben könnte. Auf Grund dessen wurden weitere Punktmutationen im Bereich der Aminosäuresequenz KATKE durchgeführt sowie Abbaukinetiken in der Ratte und Bindungskinetiken im Biacore erstellt.

### 3.6.2 Schmelzkurven punktmutierter Albumine und des Wildtyp Albumins

Von den hergestellten Punktmutationen wurden vier im Bereich der Aminosäuresequenz KATKE durchgeführt. Diese Aminosäuresequenz hatte durch die Alanisierung die kürzeste Halbwertszeit aller getesteten und wies im CD-Spektrum die größte Ähnlichkeit zum Wildtyp Albumin auf. Dieser hatte im SPR zwar eine erhöhte Affinität zum FcRn, was aber auch ein Hinweis auf eine verstärkte Bindung trotz der Alanisierung sein kann.

Im Bereich der Aminosäuresequenz ETYPKKEFNAE, die bei der Albuminvariante 1798 alanisiert wurde, konnte eine ebenfalls stark verkürzte Halbwertszeit in der Ratte festgestellt werden und keine Bindung zum FcRn im SPR. Aufgrund der starken Unterschiede in der Schmelzkurve zum Wildtyp Albumin wurde die erste und letzte Glutaminsäure alanisiert, um die Bindungseigenschaft zum FcRn auf diese beiden AS einzugrenzen.

#### 3.6.2.1 CD-Spektrum und Schmelzkurve des punktmutierten Albumins 2129

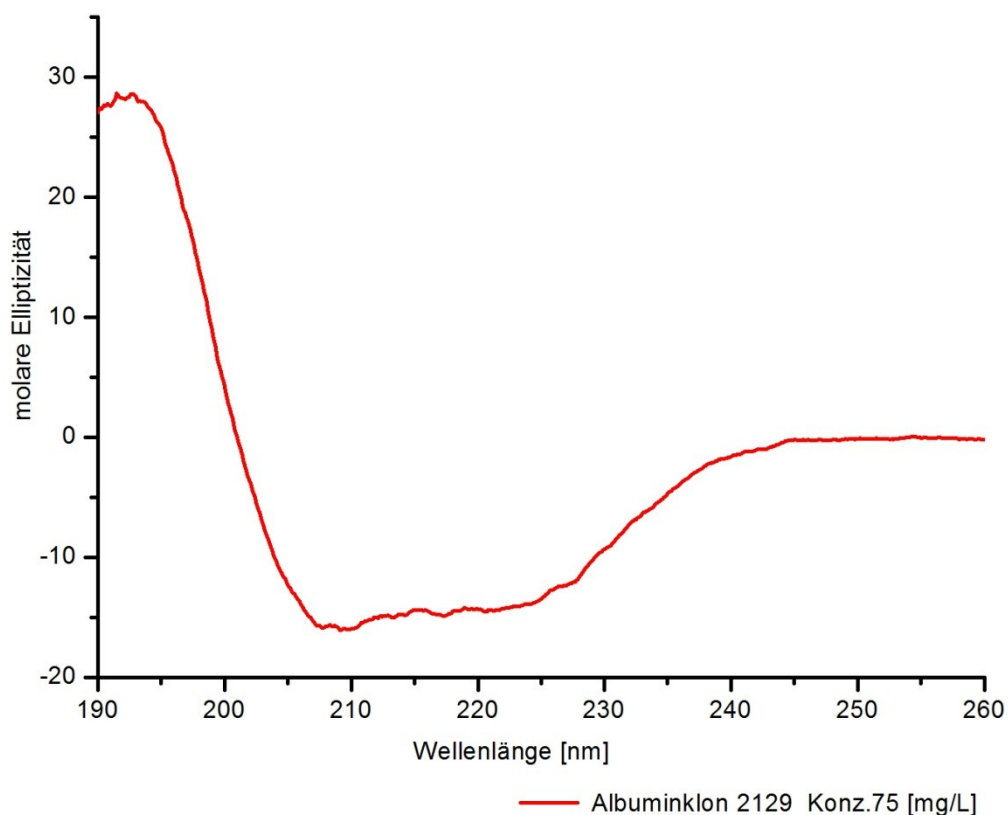
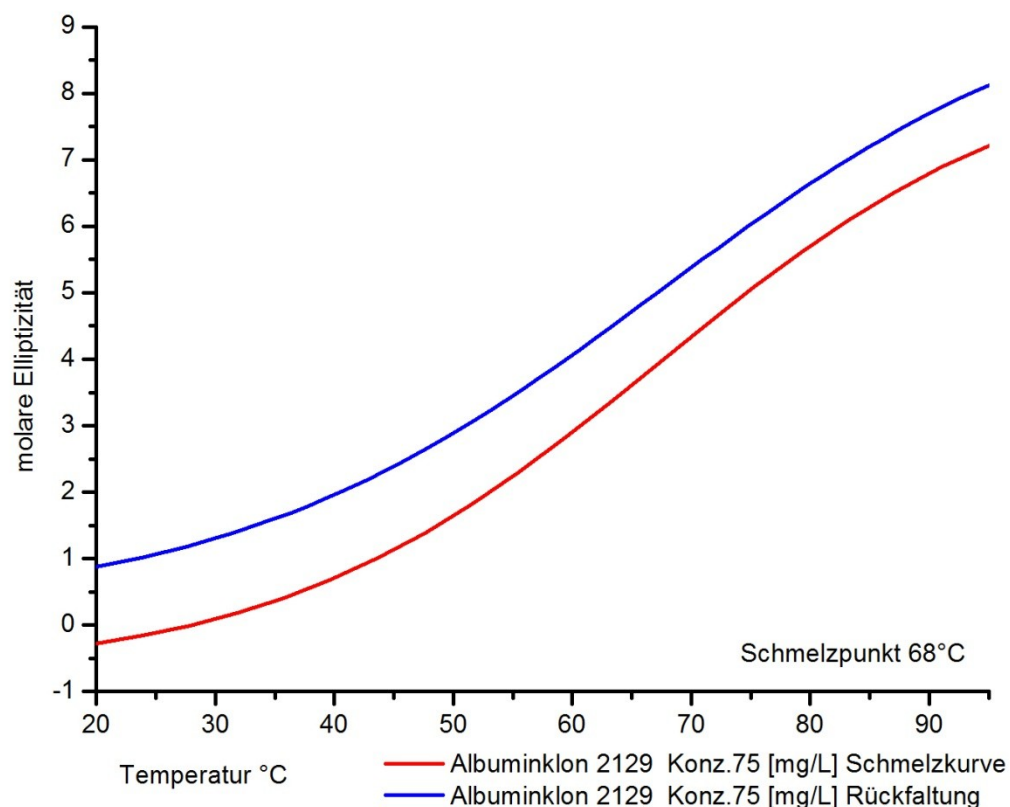


Abb. 3.63: CD-Spektrum der Albuminvariante 2129 über die Wellenlängen von 190 bis 260 nm

Die Albuminvariante 2129, bei der das erste Lysin aus der Aminosäuresequenz KATKE alanisiert wurde, hat mit 6,9 Stunden eine Halbwertszeit, die in etwa der Hälfte der des Wildtyp Albumins entspricht, die Affinität zu FcRn war um 27% erhöht.

Das CD-Spektrum ist über die meisten Wellenlängen identisch mit dem des Wildtyp Albumins. Das charakteristische Minimum bei 208 nm ist vorhanden. Sowohl das Maximum bei 215 nm als auch das Minimum bei 226 nm sind deutlich schwächer ausgeprägt.

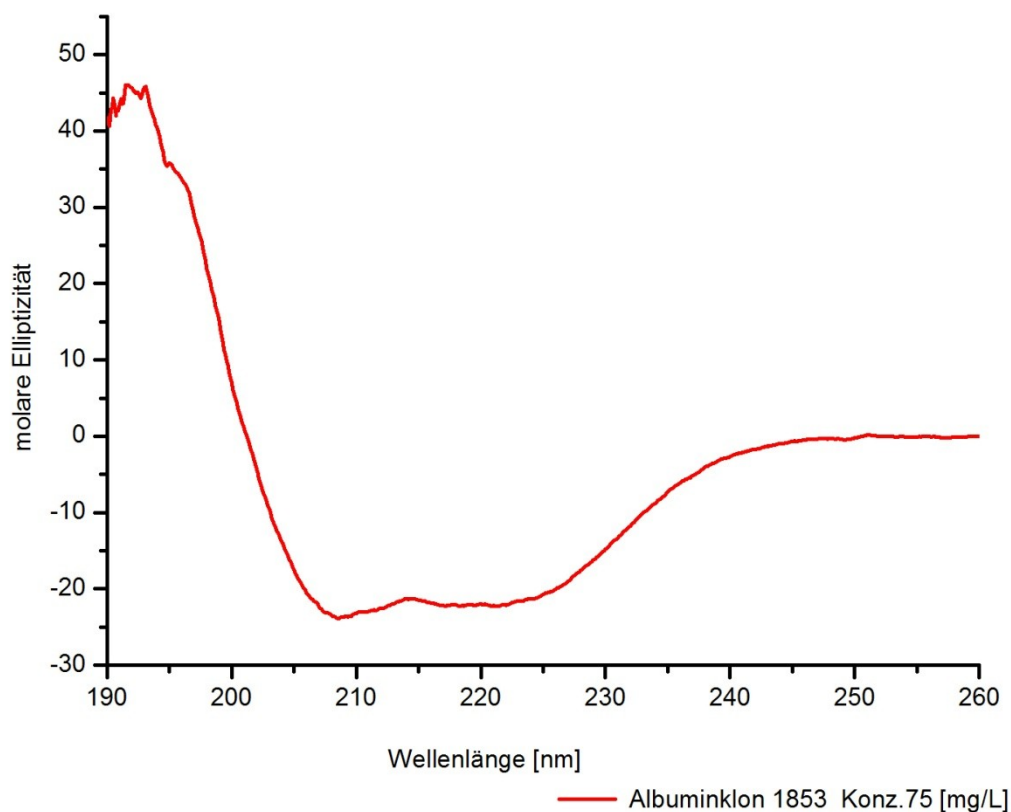


**Abb. 3.64: Schmelzkurve der Albuminvariante 2129**

Die Schmelzkurve weist einen sigmoiden Verlauf mit dem Wendepunkt bei 68°C auf, der Schmelzpunkt liegt damit 13°C unter dem des Wildtyp Albumins. Die Rückfaltung der Punktmutanten verläuft ebenfalls sigmoid, was ein Hinweis auf eine Rückfaltung zu einer unspezifischen Sekundärstruktur des Proteins ist. Die punktmutierten Albuminvariante hat hier offensichtlich eine stärker vom Wildtyp Albumin abweichende Sekundärstruktur als die alanisierte Variante 1954.

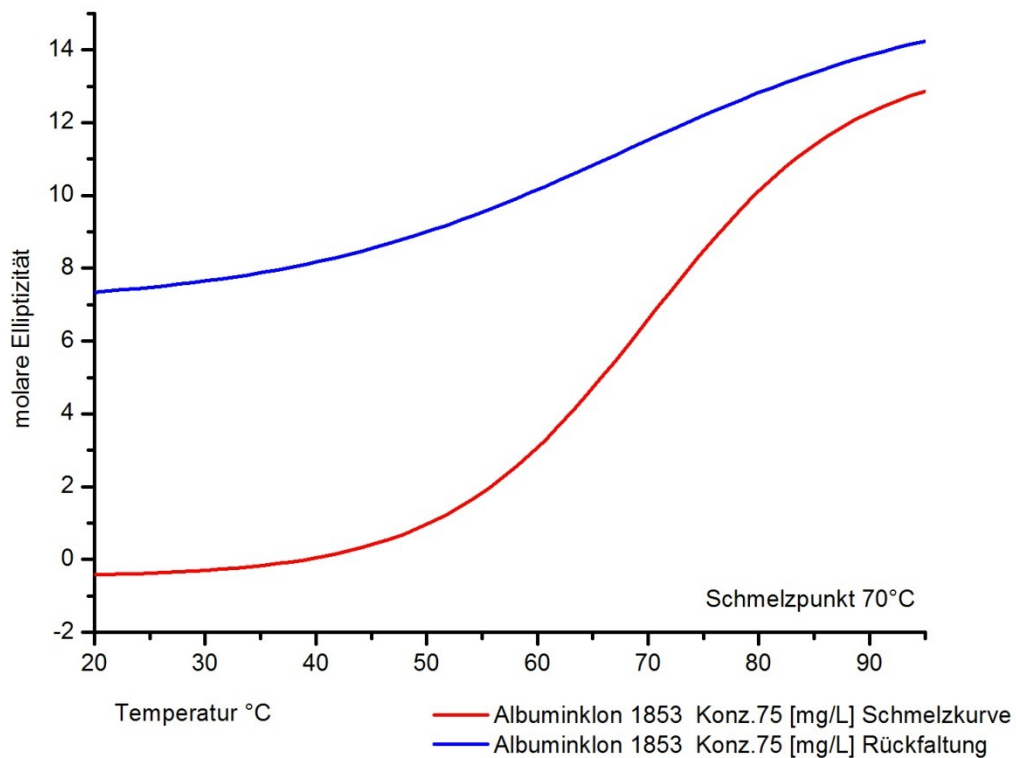
### 3.6.2.2 CD-Spektrum und Schmelzkurve des punktmutierten Albumins 1853

Bei der Albuminvariante 1853 wurden nur die erste und die letzte Glutaminsäure aus der Abfolge ETYVPKEFNAE analysiert. Diese doppelte Punktmutation wies in der Ratte eine Halbwertszeit von gerade einmal 4,8 Stunden, also etwa einem Drittel der des Albumin Wildtyps auf. Eine Bindung im SPR an den FcRn war nicht festzustellen.



**Abb. 3.65: CD-Spektrum der Albuminvariante 1853 über die Wellenlängen von 190 bis 260 [nm]**

Das CD-Spektrum der Albuminvariante 1853 weist eine sehr große Ähnlichkeit mit dem des Wildtyp Albumins auf. Verglichen mit dem von Albuminvariante 1798 sind weniger Sprünge in der molaren Elliptizität bei unterschiedlichen Wellenlängen zu erkennen. Auffällig ist das eher schwach ausgeprägte Minimum bei 226 nm.



**Abb. 3.66 Schmelzkurve der Albuminvariante 1853**

Die Schmelzkurve der Albuminvariante 1798 verläuft sigmoid und sehr ähnlich der des Wildtyp Albumins. Der Schmelzpunkt liegt mit 70°C 11°C unter dem des Wildtyp Albumins.

Der Verlauf der Rückfaltung ist ebenfalls leicht sigmoid, allerdings bei weitem nicht so ausgeprägt wie der Verlauf der alaninisierten Variante 1798.

Kleinere Unterschiede in der Sekundärstruktur verglichen zu dem Wildtyp Albumin sind aufgrund des Graphen im CD-Spektrum und der Kurve über Rückfaltung möglich, wenngleich diese auch nicht so stark ausgeprägt sind wie bei Albuminvariante 1798.

## 4 Diskussion

Die Entwicklung eines halbwertszeitverlängerten Albumins basierte auf einer Abfolge voneinander abhängiger Zwischenergebnisse. Ein Eintreffen all dieser in einem wünschenswerten Umfang war unwahrscheinlich, so dass der Titel der Arbeit, „Die Entwicklung eines halbwertszeitverlängerten Albumins“ nicht erreicht werden konnte. Dennoch konnten viele neue Erkenntnisse über die Bindung von Albumin zum FcRn und über den Zusammenhang dieser mit der Halbwertszeit von Albumin gewonnen werden. So besteht der Erfolg der Arbeit in der Findung einer Bindestelle am Albumin zum FcRn und der Aufklärung des Einflusses dieser auf die Halbwertszeit des Albumins.

### 4.1 Die Etablierung eines Testsystems

Zur Durchführung von Bindungstests zwischen dem FcRn und zahlreichen Albuminmutanten waren umfangreiche Vorarbeiten notwendig, deren zeitlicher und materieller Aufwand die eigentlichen Messungen bei weitem überstieg, was jedoch bei Aufgaben aus einem solchen Forschungsgebiet durchaus üblich ist.

So wurde ein löslicher humaner FcRn und diverse Albuminmutanten kloniert, exprimiert, analysiert und sowohl zu Abbaukinetiken im Tiermodell, wie auch zu Bindungstests im SPR bereitgestellt.

#### 4.1.1 Die Expression eines löslichen humanen FcRn

Die Expression eines löslichen humanen FcRn in CHO Zellen gelang schon vor einiger Zeit mit den zu der Zeit üblichen Methoden (Gastinel L. N. 1992). Von dieser Arbeit motiviert wurde der humane FcRn in löslicher Form exprimiert; allerdings wurden viele verwendete Methoden auf bereits in der Arbeitsgruppe etablierte modernere und schneller umzusetzende Methoden übertragen.

So wurden CHO Zellen mit zwei Expressionsplasmiden kotransfiziert, eines den FcRn enthaltende und eines dessen Untereinheit, das  $\beta$ -2 Mikroglobulin. Zur Transfektion wurde ein pMARES Expressionsvektor mit der Antibiotikaresistenz für Geniticin eingesetzt, der für eine Transfektion mittels Elektroporation mit einer hohen Transfektionseffizienz geeignet war. Die Aufreinigung erfolgte nicht durch eine



Affinitätschromatographie mit dem Liganden IgG, stattdessen wurde nur der FcRn am C-terminalen Ende mit sechs Histidinen markiert und über einen Metallchelaten aufgereinigt. Das im Überschuss exprimierte  $\beta$ -2 Mikroglobulin war während der Aufreinigung an den FcRn gebunden und konnte in ankonzentrierten Überständen im SDS-PAGE nachgewiesen werden (vgl. Kap.: 3.2.2). Gegenüber dem in der Literatur beschriebenen Herstellungsweg sind somit einige Verbesserungen getätigt worden.

#### 4.1.2 Die Expression von Albuminmutanten

Die Herstellung von rekombinantem Albumin in Hefen ist bereits seit einiger Zeit bekannt (Sleep D. 1990). Dieses System hat den Vorteil von hohen Expressionsraten und kurzen Zeiten zwischen Transfektion und Expression. Dagegen spricht eine aufwändigere Reinigung, um *host cell protein* im fertigen Produkt abzureichern, welches neben Bindungsversuchen im SPR besonders auf die Tierversuche einen negativen Einfluss haben könnte.

Weiter ist die erfolgreiche Expression von stark mutierten rekombinanten Proteinen keine Selbstverständlichkeit, häufig wird ein Protein, welches zu stark vom Wildtyp abweicht nicht oder deutlich schlechter exprimiert. Aus diesen genannten Gründen wurden mutierte Albumine zunächst in pIRES Vektoren kloniert (vgl. Kap. 3.1.1.3) und in HEK-Zellen transfiziert. Diese adhärent wachsenden Zellen haben eine sehr hohe Teilungsrate und bieten somit eine relativ kurze Produktionszeit der jeweiligen Albuminmutante. Sollte eine Expression in der HEK Zelle einer Albuminvariante nach zahlreichen Transfektionsversuchen keinen Erfolg aufgewiesen haben, wurde das mutierte Albumin-Gen in das pMARES Expressionssystem umgesetzt und auf CHO-Zellen transfiziert. Die CHO Zellen bieten nicht zwingend eine bessere Exprimierbarkeit eines rekombinanten Proteins, jedoch ist das Expressionsverhalten, insbesondere das *postprocessing* ist ein Anderes, womit die Chance einer Expression besteht. Darüber hinaus lassen sich aus den in Suspension wachsenden CHO Zellen deutlich einfacher und mit nur wenig Zeitverlust Einzelklone durch Ausverdünnen herstellen, verglichen mit den adhärent wachsenden HEK Zellen, wodurch die Chance auf ausreichend exprimierende Einzelklone zusätzlich steigt.

Der Grund für eine schlechte oder keine Exprimierbarkeit lässt sich nur schwer finden. Eukaryontische Zellen sind sehr komplex und viele Mechanismen sind noch unerforscht. Es ist aber auffällig, dass die schlechte Exprimierbarkeit einer vom Wildtyp Albumin abweichenden Mutante stark vom Ort der mutierten Aminosäuresequenz

abhängt und weniger von der jeweiligen Aminosäure, die eingesetzt wurde. So wurden sämtliche nicht exprimierbaren Albuminmutanten ausschließlich bei zwei verschiedenen Aminosäuresequenzen von sechs insgesamt mutierten aufgefunden.

**Tab.: 4.1.: Übersicht über die mutierten Albumine, die keine Expression in HEK-Zellen zeigten, aber dagegen in CHO**

Transfektion Nr.	Klon Nr.	mutierte AS, vor Mutagenese	mutierte AS, nach Mutagenese	Expression in CHO [µg/mL]
I	2063	KHPEAK	AAAAAS	6,7
II	1954	KATKE	AAAAS	7,5
III	2129	KATKE	AATKE	6,6
IV	2166	KATKE	QATKE	8,3
V	2167	KATKE	HATKE	7,5
VI	2168	KATKE	KATKD	6,3

Die Alanisierungen und Punktmutationen der in Tab.: 4.1 dargestellten Aminosäuresequenzen konnten nicht in HEK-Zellen exprimiert werden. Diese Mutationen beschränkten sich auf nur zwei unterschiedliche Sequenzbereiche. Der Grund für die schlechte Exprimierbarkeit ist unbekannt und könnte in der Mutation von stark konservierten Aminosäuresequenzen liegen, die einen besonderen Einfluss auf die Faltung des Proteins haben. Das Protein kann teilweise, gar nicht oder anders gefaltet exprimiert werden und dadurch bedingt von zelleigenen Mechanismen gleich wieder abgebaut werden. Die CHO Zelle exprimiert diese Mutanten sehr gut (vgl. Tab.: 4.1), was womöglich weniger an einem von der HEK Zelle abweichenden Expressionsmechanismus liegt, als an der Tatsache, dass für diese in CHO exprimierten Albumine zahlreiche Einzelklonkultivierungen im ELISA auf Albumin untersucht wurden, wodurch bereits selektiert wurde.

Die Zerstörung möglicher Epitope für die beim ELISA beteiligte Antikörper konnte durch die Verwendung von polyklonalen Antikörpern mit einer Affinität zu mehreren Epitopen ausgeschlossen werden.

#### 4.1.3 Die Etablierung eines SPR-Bindungsassays von FcRn zu Albumin

Zur Etablierung eines Bindungsassays von FcRn zu Albumin bestand der erste Schritt in einer Immobilisierung einer der beiden Bindungspartner. Dabei wurde in Elektrostatikversuchen (vgl. Kap. 3.5.1) sowohl für die Immobilisierung von Albumin, als auch für die Immobilisierung von FcRn ein optimaler pH Wert ermittelt.

Die Immobilisierung des jeweiligen Liganden erfolgte kovalent über deren Aminogruppen an den *SPR chip*. Dabei stellte sich heraus, dass sich der FcRn etwas schlechter immobilisieren ließ als Albumin. Die Änderung des Brechungsindex von 3100 *response units* des FcRn gegenüber von 4700 *response units* von Albumin ist teilweise über das etwas höhere Molekulargewicht von Albumin gegenüber dem FcRn zu erklären, so dass die unterschiedlichen Schichtdicken bei der Immobilisierung vernachlässigbar sind.

Um so bemerkenswerter ist die Tatsache der unterschiedlichen Funktion der beiden Liganden im Hinblick auf deren Fähigkeit, den Bindungspartner im immobilisierten Zustand zu binden. Immobilisiertes Albumin hatte eine erheblich höhere Affinität zum FcRn, als der immobilisierte FcRn zum Albumin. Obwohl ein immobilisierter FcRn bei Bindungstests zu mehreren Albuminen in einer mobilen Phase, den günstigeren Versuchsaufbau im Bezug auf die Handhabbarkeit dargestellt hätte, wurde sich auf Grund des geringeren Proteinbedarfs für den Versuchsaufbau entschieden, sämtliche mutierten Albumine auf einer eigenen Flusszelle eines *SPR chips* zu immobilisieren.

Die Ursache für die schlechteren Bindungseigenschaften des FcRn im immobilisierten Zustand im Vergleich zum Albumin liegt womöglich in dessen Empfindlichkeit gegenüber der Kopplungschemie begründet. Albumin ist möglicherweise unempfindlicher gegenüber der eingesetzten Kopplungschemie, den Chemikalien NHS und EDC.

Der Beweis für die Funktion des FcRn erfolgte erst im SPR durch einen Bindungsversuch des immobilisierten FcRn an ein plasmatisches IgG Präparat und Serumalbumin. Dabei wurden zuvor in der Literatur beschriebene Bindungskonstanten aus den generierten Bindungskurven berechnet (vgl. Kap.: 3.5.3). Der etablierte SPR Bindungstest wurde durch diese Vorversuche für weitere Bindungstests zu Albuminmutanten als geeignet bewertet und eingesetzt.

Die Abbaukinetiken für Albumin erstellt aus Tierversuchen waren hingegen schon etabliert. Das Abbauverhalten von Wildtyp Albumin diente als Referenz für die

Albuminmutanten. Dieses entsprach weitestgehend auch dem von anderen Arbeitsgruppen publizierten zweistufigen Abbau von Albumin im Tier (Nicholson J. P. 2000).

In der Arbeit wurde ein funktionierendes Testsystem für Bindungen zum FcRn durch SPR aufgebaut. Durch dieses konnte, kombiniert mit Tierversuchen, eine Bindung zwischen dem FcRn und Albumin in Beziehung zu seinem Abbauverhalten gesetzt werden. So wurden bei der Versuchsplanung zuvor bereits Aussagen postuliert, die durch ein bestimmtes Abbauverhalten einzelner mutierter Albumine kombiniert mit deren Affinität zum FcRn für die mutierte Sequenz zutreffen sollten. (vgl. 1.5.1.3)

## **4.2 Die Untersuchung der Bindestelle von Albumin an den FcRn**

Die Bindung von Albumin an den FcRn ist bewiesen und es wurde gezeigt, dass es sich dabei um eine spezifische pH-Wert abhängige Bindung handelt (Chaudhury C 2003). Bei der Bindestelle am FcRn wurde durch *Peptidmapping* das Histidin an Stelle 166 des FcRn als für die Bindung essentiell befunden. Einige weitere Aminosäuren werden verdächtigt an der Bindung beteiligt zu sein (Andersen JT., 2006).

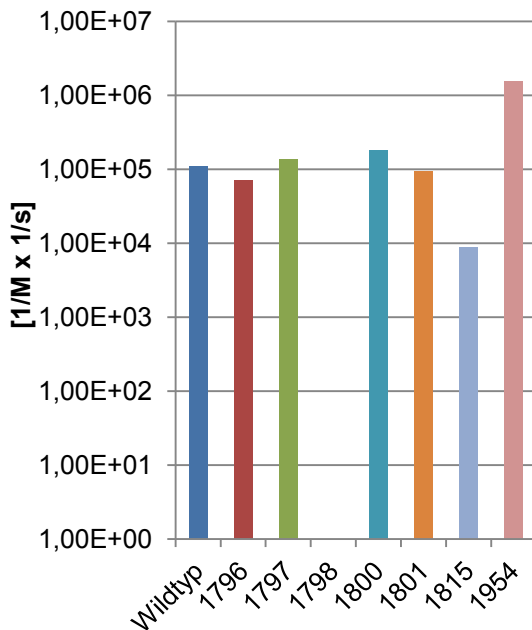
Über die Bindestelle im Albumin zum FcRn ist derzeit nur bekannt, dass sie in der dritten Domäne liegt und pH abhängig ist. Aus der pH Abhängigkeit und der Beteiligung eines Histidins an der Bindung von Seiten des FcRn lässt sich für eine potentielle Bindestelle im Albumin auf eine Aminosäure mit einer basischen oder sauren Nebengruppe schließen. Diese Nebengruppe müßte durch eine Änderung des pH-Wertes ihre Ladung wechseln können. Die folgenden, von Seiten der Bioinformatik vorgeschlagenen (vgl. Kap. 1.5.1.1) und getätigten Mutagenesen im Albumin wurden im Hinblick auf Ihre Bindung zum FcRn durch SPR getestet. Weiter wurden Abbaukinetiken in der Ratte erstellt. (vgl. Kap.: 3.5 und Kap.: 3.4) Aus den daraus gewonnenen Daten konnten Aussagen über bestimmte Aminosäuresequenzen des Albumins auf deren Bindung zum FcRn gemacht werden. Die Ergebnisse wurden an Hand der zuvor postulierten möglichen Aussagen interpretiert (vgl. Kap.: 1.5.1.3).

#### 4.2.1 Der Ausschluß zahlreicher Aminosäuren im Albumin als potentielle Bindestelle zum FcRn

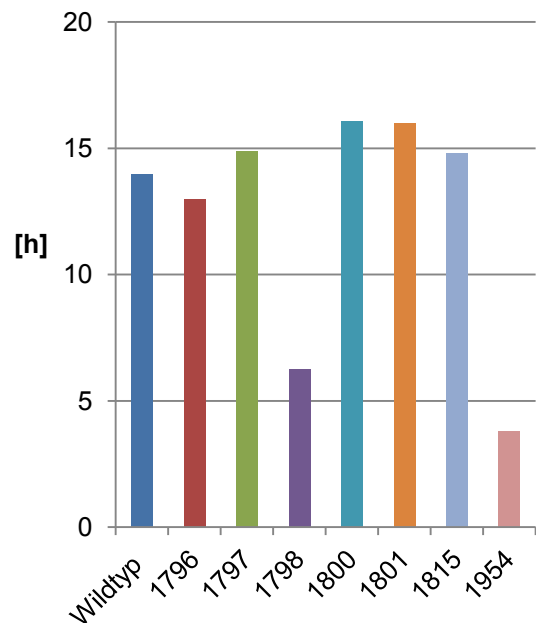
Aus einem Vergleich der Halbwertszeiten in der Ratte mit den durch SPR bestimmten Bindungskonstanten der alaninisierten Albumine vgl. Tab.: 4.2: Übersicht über die alaninisierten Aminosäuresequenzen konnten einige Aminosäuresequenzen sowohl als Bindungspartner zum FcRn, wie auch als Beteiligte an einem Abbaumechanismus ausgeschlossen werden. Weil die bestimmten Eigenschaften dieser dem in Kap. 1.5.1.3 postulierten Fall 2 entsprachen.

Tab.: 4.2: Übersicht über die alaninisierten Aminosäuresequenzen, für eine Bindung zum FcRn ausgeschlossen (schwarz), an einer Bindung zum FcRn beteiligt (rot).

Nr.	Klon Nr.	alanisierte AS	AS Position im Albumin
I	1796	KHPEAK	439-444
II	1797	KTPV	466-469
III	1798	ETYVPKEFNAE	495-505
IV	1954	KATKE	538-542
V	1800	KADDKET	560-566
VI	1801	KLVAASSQAA	574-582
VII	1815	KADDKET+ T-515	560-566+T-515



**Abb. 4.1: Assoziationskonstanten von alaninisierten Albuminen**



**Abb. 4.2: Halbwertszeiten alanisierter Albumine in der Ratte**

Aus den in Abb. 4.1 und Abb. 4.2 dargestellten Assoziationskonstanten verglichen mit den Halbwertszeiten lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

Die Assoziationskonstanten der Albuminmutanten 1796, 1797, 1800 und 1801 sind nahezu identisch mit der des Wildtyp-Albumins, woraus ein stark vergleichbares Bindungsverhalten dieser zum FcRn abzuleiten ist. Die Halbwertszeiten dieser Albuminmutanten in der Ratte liegen zwischen 13 und 16 Stunden, die des Wildtyp-Albumins bei 14 Stunden, deren Abbau *in vivo* ist somit vergleichbar.

Die Vergleichbarkeit der Albumin Mutanten 1796, 1797, 1800 und 1801 wurde im Hinblick auf Ihren Abbau und Bindung zum FcRn neben den hier genannten beiden Parametern ausführlich untersucht und deren Vergleichbarkeit konnte bestätigt werden (vgl. Kap.: 3.4 und 3.5 ).

Demnach ist für diese Albuminmutanten im Hinblick auf die bereits vor der Durchführung postulierte Aussage für diese Versuche (vgl. Kap. 1.5.1.3) die folgende Aussage zu treffen: Die in Tab.: 4.2 in schwarz dargestellten Aminosäuresequenzen Nummer 1796, 1797, 1800 und 1801, haben weder ein vom Wildtyp-Albumin abweichendes Bindungsverhalten zum FcRn, noch eine abweichende Halbwertszeit. Somit sind sie als potentielle Bindestelle zum FcRn und einen über diesen vermittelten

postulierten Abbauweg auszuschließen. Weiter scheinen diese alaninisierten Aminosäuresequenzen keinen Einfluss auf die Halbwertszeit über jegliche Abbauwege zu haben.

Die Albuminvariante 1815, deren alanisierte Aminosäuresequenz sich von der Albuminvariante 1801 nur um ein weiteres zusätzliches alanisiertes Threonin unterscheidet (vgl. Tab.: 4.2), weist dagegen eine leicht verminderte Bindung zum FcRn auf. Die Assoziationskonstante ist um eine Zehnerpotenz geringer als die des Wildtyp-Albumins und weist damit gerade noch einen signifikanten Unterschied in der Affinität zum FcRn hin. Die Halbwertszeit von Albuminvariante 1801 ist dagegen vergleichbar mit der des Wildtyps, obwohl die Abbaukurve besonders in der ersten exponentiellen Phase einen davon abweichenden Verlauf hat (s.h. Abb. 3.27)

Demnach ist für die Albuminvariante 1815 im Hinblick auf die bereits vor der Durchführung postulierte Aussage für diese Versuche (vgl. Kap.: 1.5.1.3), die folgende Aussage zu treffen: Die in Tab.: 4.2 in dargestellte Albuminvariante 1815 muss bei der Bindung zum FcRn beteiligt sein und diese Bindung und damit der FcRn hat womöglich keinen Einfluss auf den Abbau von Albumin.

Allerdings setzt diese These eine Überprüfung der korrekten Faltung der Albuminmutante voraus. Diese wurde durch die Erstellung eines CD-Spektrums und einer Schmelzkurve überprüft; dabei diente das Wildtyp Albumin als Referenz. Das CD-Spektrum wies keine Hinweise für die für Albumin so typischen  $\alpha$ -helikalen Strukturen auf. Der Schmelzpunkt lag mit 64°C deutlich unter dem des Wildtyp Albumins von 81°C.

Die Schlussfolgerung für die durch Albuminvariante 1815 getestete Aminosäuresequenz lautet: Die Alanisierung von Threonin 515 zusätzlich zu der Sequenz KADDKET führt zu einem degradierten und unspezifisch gefalteten Albumin. Die mutierte Sequenz ist für das Protein so stark konserviert, dass eine Mutation nicht möglich ist, ohne das Protein in seiner Struktur zu beeinflussen. Somit erübrigen sich weitere Mutationen an dieser Stelle, eine potentielle Bindung an den FcRn durch diese Aminosäuren ist damit zwar nicht ausgeschlossen, jedoch erscheint eine weitere Untersuchung nicht sinnvoll. Diese würde eine Expression mit korrekter Faltung voraussetzen, wenn das möglich wäre.

#### **4.2.2 Die Eingrenzung der Bindestelle von Albumin an FcRn auf zwei Aminosäuresequenzen**

Besonders auffällig sind die deutlich verkürzten Halbwertszeiten der Albuminmutanten 1798 und 1954 (vgl. Tab.: 4.2: Übersicht über die alaninisierten Aminosäuresequenzen).

So führte die Alanisierung der Sequenz von Albuminvariante 1798 zu einer um die Hälfte verkürzten Halbwertszeit in der Ratte. Dieses schnelle Abbauverhalten spiegelt sich ebenfalls in anderen berechneten Parametern der Tierstudie wider, z. B. in einer Verdoppelung der Eliminationsgeschwindigkeitskonstanten. Zusätzlich dazu war keine Bindung zum FcRn durch SPR mehr messbar (vgl. Abb. 3.48), eine Bindung findet demnach nicht statt. Dieses auffällige Abbau- und Bindungsverhalten gab Anlass zu einer Überprüfung der Faltung durch CD-Spektroskopie und Schmelzpunktanalyse. Das CD-Spektrum entsprach weitestgehend dem des Albumin Wildtyps. Die Schmelzpunktanalyse dagegen zeigte eine deutliche Herabsetzung des Schmelzpunktes um 12°C gegenüber dem Wildtyp Albumin, so dass ein degradiertes oder nicht dem Wildtyp entsprechend gefaltetes Protein vorliegen könnte. Sollte jedoch das Gegenteil der Fall sein und die nicht vorhandene Affinität zum FcRn im SPR und die verkürzte Halbwertszeit in der Ratte nicht strukturbedingt sein, ist eine potentielle Bindestelle zum FcRn in dieser alaninisierten Sequenz wahrscheinlich und ein damit zusammenhängender Abbau- und Recyclingmechanismus durchaus anzunehmen.

Daher wurde sich für eine Alanisierung von nur zwei Aminosäuren aus der relativ langen Sequenz von elf Aminosäuren entschieden, die von Seiten der Bioinformatik, für besonders wahrscheinlich eingestuft wurden, an einer Bindung zum FcRn beteiligt zu sein (vgl. Kap. 1.5.2.1). Die Bindungstests sowie die Abbaukinetik mit dieser erneut durchgeführt (vgl. Kap. 3.4.2 und 3.5.6).

Die Albuminmutante 1954 wies die kürzeste gemessene Halbwertszeit in der Ratte von weniger als vier Stunden auf. Die Bindung an den FcRn im SPR wurde dagegen als leicht verstärkt interpretiert, die Assoziationskonstante lag gerade um eine Zehnerpotenz über der des Wildtyp Albumins, so dass man diese noch als stärkere Affinität zum FcRn deuten kann.

Eine an den FcRn verstärkte Bindung gegenüber dem Wildtyp Albumin bei einer deutlich verkürzten Halbwertszeit gegenüber diesem würde eine durch die Mutation verstärkte Bindestelle zum FcRn an die alanisierte Aminosäuresequenz indizieren. Bei dessen verstärkter Bindung nimmt die Halbwertszeit allerdings sehr deutlich ab,



wodurch der FcRn als ein für den Abbau zuständiger Rezeptor postuliert werden könnte. (vgl. 1.5.1.3.).

Eine weitere Option besteht darin, dass die Sekundärstruktur von der Mutation beeinflusst würde, wodurch ein sehr stark gesteigerter Abbau der Albuminvariante induziert wird. Grund für die Annahme gibt eine Schmelzpunktanalyse, durch die ein um 11°C verminderter Schmelzpunkt dieser Mutante zum Wildtyp Albumin festgestellt worden ist (vgl. Abb. 3.62.). Die leicht verstärkte Bindung zum FcRn im SPR könnte demnach auch als ein Artefakt einer unspezifischen Bindung, bedingt durch Degradierung interpretiert werden.

In jedem Fall geben die Ergebnisse aus der relativ kurzen Aminosäuresequenz KATKE ausreichend Anlass für weitere Punktmutationen: zum Einen, um die möglicherweise leicht gesteigerte Bindung zum FcRn zu überprüfen, ohne Einfluss auf die Faltung des Proteins zu nehmen und zum Anderen, um die eventuell vorhandene Bindung zu verstärken, ohne ebenfalls Einfluss auf die Sekundärstruktur zu nehmen. Dadurch könnte die These für einen reinen Abbau-Rezeptor untermauert werden könnte.

#### 4.2.3 Die Feinanalyse von punktmutierten Albuminen

Aufbauend auf den in Kap. 4.2.2 diskutierten und durch ihre stark verkürzte Halbwertszeit in der Ratte aufgefallenen Albuminmutanten durch Alanisierung zwei verschiedener Aminosäuresequenzen bedingt, wurden die in Tab.: 4.3 dargestellten Aminosäuren ausgetauscht und die eprimierten Albuminvarianten gleichen Analytik unterzogen, die Auswahl der getätigten Mutagenesen basierte auf bioinformatischen Analysen (vgl. 1.5.2.1).

Tab.: 4.3: Übersicht über weitere Punktmutagenesen, der Albuminvariante 1798 und 1954

Nr.	Klon Nr.	Punktmutierte AS
I	2129	AATKE
II	2166	QATKE
III	2167	HATKE
IV	2168	KATKD
V	1853	ATYVPKEFNAA

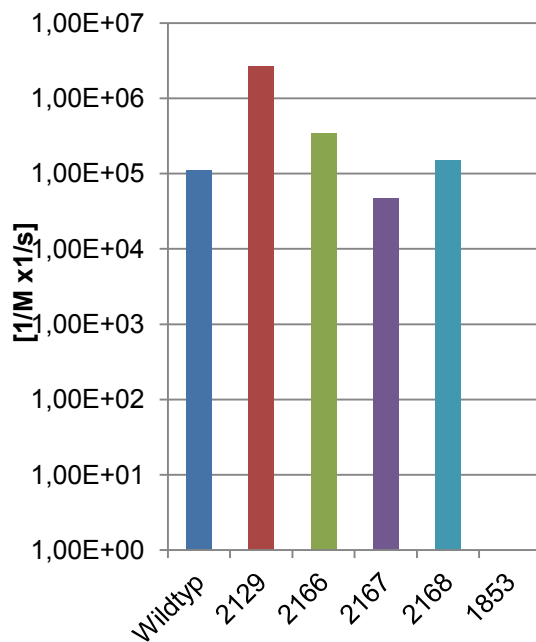


Abb. 4.3.: Assoziationskonstanten von punktmutierte Albumine zum FcRn

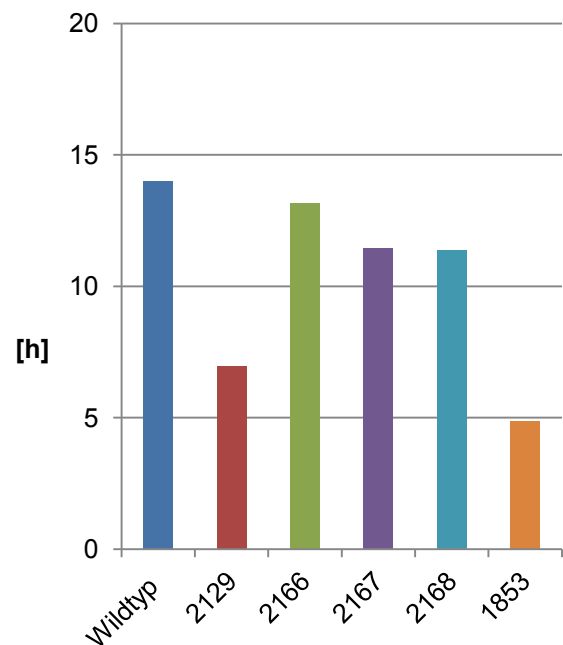


Abb. 4.4.: Halbwertszeiten punktmutierter Albumine in der Ratte

#### 4.2.4 Eine mögliche Bindesstelle von Albumin zu FcRn.

Die beiden Graphen Abb. 4.3 und Abb. 4.4 zeigen für den Albuminklon 1853, in dem zwei Glutaminsäuren zu Alanin mutiert wurden, wie bei der Alanisierung der gesamten Sequenz keine Bindung des Albuminklons im SPR. Die Halbwertszeit ist ebenfalls wie bei der Alanisierung der gesamten Sequenz deutlich vermindert, von 14 Stunden auf weniger als fünf Stunden.

Eine deutlich verkürzte Halbwertszeit kombiniert mit einer fehlenden Bindung an den FcRn im SPR, hervorgerufen von nur zwei punktmutierten Glutaminsäuren zu Alanin, lassen unter der Berücksichtigung der pH Abhängigkeit folgenden Schluss zu: Diese beiden Glutaminsäuren oder auch nur eine der beiden ist für die Bindung des FcRn essentiell. Kombiniert mit der stark verkürzten Halbwertszeit dieser doppelten Punktmutante ist die Verbindung zwischen der Bindung an den FcRn und der verlängerten Halbwertszeit eines Albumins in einer repräsentativen Studie mit ausreichend Tieren dargestellt und belegt worden.

Der Einfluss des FcRn auf die Halbwertszeit von Albumin ist dadurch an Hand von Daten belegt und ergänzt das etwas lückenhafte Ergebnis früherer Studien mit nur drei FcRn *knock-out* Mäusen (Chaudhury C 2003).

#### **4.2.5 Die potentielle Bindestelle in der Aminosäuresequenz KATKE**

Die Punktmutanten 2166, 2167 und 2168 (s.h. Tab.: 4.3) im Bereich der Aminosäuresequenz KATKE zeigten weder in ihrer Affinität zum FcRn im SPR gemessen einen nennenswerten Unterschied zum Wildtyp Albumin noch in ihrer Halbwertszeit in der Ratte. Folglich beeinflussen diese weder den Abbau von Albumin, noch die Bindung an den FcRn wesentlich.

Die Alanisierung des ersten Lysins dieser Sequenz, in der Mutante 2129 (Tab.: 4.3) führte dagegen zu einem mit der Alanisierung der gesamten Sequenz vergleichbaren Ergebnis. Die durch SPR bestimmte Assoziationskonstante zum FcRn ist ebenfalls nicht vehement aber merklich erhöht und weist auf eine erhöhte Affinität hin. Die Halbwertszeit dieser Punktmutante liegt in der Ratte wie bei der Alanisierung der gesamten Sequenz in etwa bei der Hälfte des Wildtyp-Albumins.

Daraus ergeben sich die gleichen Schlüsse wie bereits für den zuvor getesteten Albuminvariante 1954 (s.h. Kap. 4.2.2). Wenn auch das CD-Spektrum der Albuminvariante 2129 große Ähnlichkeit zum Wildtyp-Albumin zeigt, garantiert es nicht ein dem Wildtyp entsprechend gefaltetes Albumin. Kleinere Unterschiede in der Faltung könnten die stärkere Dissoziation erklären.

Die auf Basis der Ergebnisse der durch die Punktmutation der beiden Glutaminsäuren an Stelle 519 und 529 in der Albuminvariante 1853 getroffenen Aussage, einer potentiellen Bindestelle zum FcRn mit Einfluss auf die Halbwertszeit des Albumins (vgl. Kap.: 4.2.4), ist die Funktion des Lysins an Stelle 538, alanisiert im Albuminklon 2129 (vgl. Tab.: 4.3), auf Grund ihrer räumlichen Nähe wahrscheinlich.

Das Lysin an Stelle 538 ist für die Struktur des Albumins möglicherweise essentiell, so dass die stark verkürzte Halbwertszeit durch einen Abbau der Albuminvariante bedingt durch eine Degradierung stattgefunden hat. Die dabei verstärkte Bindung an den FcRn wurde sowohl bei der Alanisierung des ersten Lysins sowie bei der Alanisierung der gesamten Sequenz beobachtet, wie anhand von Albuminklon 1954 gezeigt wurde. Dies bekräftigt die zuvor postulierte Funktion eines für den Abbau zuständigen

Rezeptors. Diese Funktion würde im Gegensatz zu dem in Kap. 4.2.4 postulierten Mechanismus eines potentiellen Recyclingmechanismus stehen und dadurch eine abschwächende Wirkung auf diesen haben. Bedingt durch die räumliche Lage dieser beiden Sequenzen im Albumin wäre eine gleichzeitige Bindung vom FcRn an beide Aminosäuresequenzen möglich und ein konkurrierender Recycling- und Abbaumechnismus könnte die Grundlage zur Erklärung der bisher häufig in der Literatur gezeichneten endosomalen, lysosomalen Abbau- oder Recyclingwege, die auf phantasievollen Spekulationen aber auf keinerlei wissenschaftlich gewonnen Messungen beruhen, erklären. Es sind bisher nur einer lückenhafte Abbaukinetik in einer FcRn *knock-out* Maus erstellt worden. (Roopenian D. C. 2007 ), (vgl Kap. 1.3.1).

#### **4.2.6 Gleichzeitige Forschungen anderer Arbeitsgruppen**

In der Zeit der Durchführung der Arbeit sind zu der Bindung zwischen Albumin und FcRn nur wenige wissenschaftliche *Publikationen* erschienen und entsprechend nur wenige neue Erkenntnisse veröffentlicht worden.

Bis zum Zeitpunkt der Abgabe der Arbeit haben zwei weitere Arbeitsgruppen durch Publikationen ihrer untersuchten und für eine Bindung zum FcRn in Frage kommenden Aminosäuren im Albumin auf sich aufmerksam gemacht.

So wurde bereits die Glutaminsäure an Stelle 505 im Albumin als für eine Bindung zum FcRn als relevant postuliert; diese soll in einem Rechenmodell an das im FcRn für die Bindung verantwortliche Histidin an der Stelle 166 binden; praktische Experimente dazu wurden jedoch nicht durchgeführt (Kenanova VE., 2010) (Andersen JT., 2006). Die Bindung wurde in dieser Arbeit experimentell bewiesen (vgl Kap.:4.2.4). Dagegen wurden in der Arbeit von (Kenanova V. E. 2010) andere Aminosäuren für die Bindung zum FcRn verantwortlich gemacht. Die Histine an den Stellen 464, 510 und 535 wurden alanisiert, radioaktiv markiert und mit carcinoembryonalem Antigen fusioniert. Durch subkutane Applikation in Mäuse, denen zuvor humane Karzinome injiziert wurden, wurde das Fusionsprotein als Tumormarker eingesetzt und über eine Kombination von bildgebenden Verfahren, auf Basis der Messung der radioaktiven Markierung des Fusionsproteins, wurden Schlüsse auf dessen Halbwertszeit in der Maus gezogen. Dazu ist zu hinterfragen, ob der Nachweis der Isotope eines damit markierten Albuminfragments in einem Fusionsprotein mit carcinoembryonalem Antigen eine Aussage für die Funktion des Albuminfragments gibt. Des Weiteren hat der Fusionspartner des Albumins, das carcinoembryonale Antigen, ebenfalls eine

lange Halbwertszeit und eine sehr hohe Affinität zu den der Maus zuvor injizierten humanen Karzinomen, so könnten Unterschiede in den gemessenen Halbwertszeiten auch durch diese Bindung bedingt sein. Dazu muss beachtet werden, daß eine Bindung von humanem Albumin zum FcRn der Maus durch *in vitro* Versuche bereits schlüssig widerlegt wurden. (Andersen JT. 2009)

Der vermeintlichen Verlängerung der Halbwertszeit durch die Alanisierung von jeweils einem der drei Histine an den Stellen 464, 510 und 535 in einem Albuminfragment in einem Fusionsprotein wirft keinerlei Bezug zum FcRn auf. Bindungsversuche zu diesem wurden weder *in vitro*, noch wurden Kontrollen mit nicht fusioniertem Wildtyp Albumin durchgeführt. Des Weiteren muss das Verfahren der Bestimmung der Halbwertszeit über die graphische Sichtbarmachung von einem durch Isotope markiertem Fusionsprotein, welches dazu noch subkutan verabreicht wurde, als nicht optimal angemerkt werden.

Die auf Computermodellen basierenden, postulierten potentiellen Bindestellen von Albumin zum FcRn geben aber einen guten Ansatz für weitere Mutationen zur Charakterisierung der Bindestelle. Vgl. (Kenanova V. E. 2010) Von diesen berechneten Bindestellen war die Glutaminsäure 505 auch Gegenstand der berechneten Vorhersagen, die Ausgangspunkt für diese Arbeit waren (Hofmann K., 2007). Ansonsten wiesen beide Voraussagen für eine potentielle Bindung keine Übereinstimmungen auf.

In weiteren Arbeiten sind im Rahmen einer Patentoffenlegung zahlreiche Aminosäuren im Albumin als potentielle Bindungspartner zum FcRn beansprucht worden die beinahe der gesamten dritten Albumin Domäne entsprechen. (Plumridge A. 2011) Darunter sind auch die Glutaminsäuren an der Stelle 495 und 505, die in dieser Arbeit als Bindestelle zum FcRn gefunden wurden,

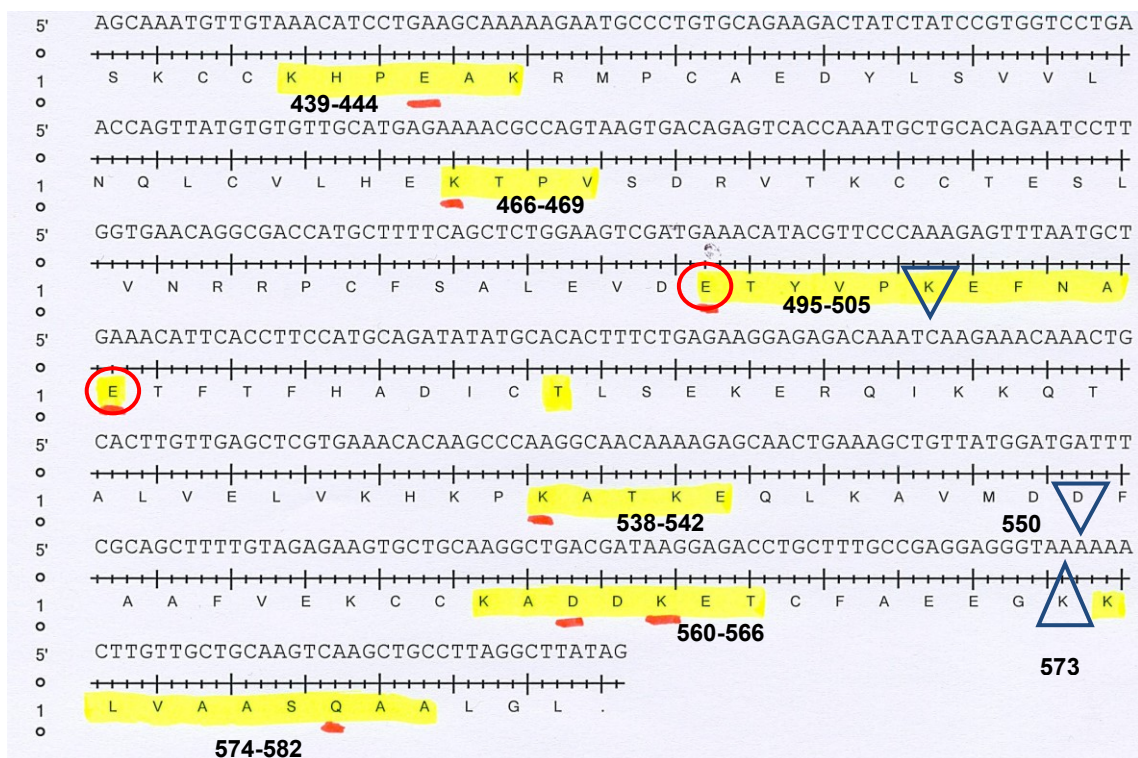


Abb. 4.5.:

Übersicht über die in dieser Arbeit mutierten AS (gelb), in blauen Dreiecken die von (Plumridge A. 2011) für eine Bindung beanspruchten Aminosäuren, nach oben zeigende Dreiecke beanspruchen die Bindung verstärkende und nach unten zeigende Dreiecke die Bindung abschwächende Aminosäuren, rot eingekreist die in dieser Arbeit gefundenen Bindestellen 495 und 505

Die Substitution dieser, durch zahlreiche andere Aminosäuren in Kombination mit Weiteren wird in dem Patent beansprucht, konkrete Messungen durch SPR wurden bei alleiniger Mutation einer dieser beiden Aminosäuren nicht veröffentlicht. E 505 wurde kombiniert mit acht weiteren Aminosäuren zusammen durch ein Lysin substituiert, wodurch eine abgeschwächte Bindung zum FcRn nachgewiesen werden konnte, ob tatsächlich nur E 505 dafür verantwortlich ist oder eine der acht weiteren substituierten Aminosäuren bleibt offen.

Dagegen wurden im Rahmen der Untersuchungen (Plumridge A. 2011) durch Alanisierung jeweils des Histidins, des Lysins und der Asparaginsäure an den Stellen 464, 500 und 550 der dritten Albumindomäne eine Teilinhibierung der Bindung zum FcRn gefunden. Diese Aminosäuren wurden von Seiten der für diese Arbeit konsultierten Bioinformatik nicht in Betracht gezogen und demnach auch nicht untersucht. (Hofmann K., 2007)

Durch die Alanisierung des Lysins an der Stelle 573 dagegen wurde eine verstärkte Bindung, bedingt durch ein sehr langsames Dissoziationsverhalten beobachtet, bei mit dem Wildtyp vergleichbarem Assoziationsverhalten zum FcRn. Dieser Effekt einer verstärkten Bindung, bedingt durch eine schwache Dissoziation konnte durch die Substitution anderer Aminosäuren, insbesondere Threonin und Valin gesteigert werden. Das verstärkte Dissoziationsverhalten bei gleichem Assoziationsverhalten könnte allerdings auch durch degradiertes Albumin, bedingt durch die Mutationen sein. In der Patentschrift gibt es jedoch keine Hinweise auf eine Untersuchung der Qualität der Albumine im Hinblick auf Ihre Tertiärstruktur.

Es wurden in dieser Patentschrift umfangreiche Daten zur Veränderung der Bindungseigenschaften zwischen FcRn und Albumin dargestellt. Es wurde aber keinerlei Bezüge zu einer möglichen Halbwertszeitverlängerung hergestellt. Ob diese hier gezeigten, stärker bindenden Albumine tatsächlich einen Einfluss auf deren Halbwertszeit haben, muss noch in Tierversuchen gezeigt werden.

Die einzige Arbeit, in der bisher eine veränderte Bindungsstärke von Albumin zum FcRn in Korrelation zu dessen zur Halbwertszeit dargestellt werden konnte, ist die hier vorgelegte Dissertation.

### 4.3 Ausblick in zukünftige Forschungen

Mit der Inhibierung der Albuminbindung zum FcRn durch Alanisierung zweier Glutaminsäuren und durch den Beweis einer dadurch bedingten verkürzten Halbwertszeit ist ein weiterer Meilenstein in der Forschung der beiden Proteine erreicht worden.

Damit eine Korrelation zwischen der Bindung beider Proteine und der Halbwertszeit von Albumin bewiesen worden ist, wird die Entwicklung eines halbwertszeitverlängerten Albumins einen Schritt näher. So könnten als Nächstes Untersuchungen über die Möglichkeit einer Verstärkung der Bindung von Albumin zum FcRn durch weitere Mutagenesen der Glutaminsäuren 495 und 505 durchgeführt und der Bezug zu einer potentiell verlängerten Halbwertszeit im Tier hergestellt werden. Dabei könnte auch mit neuen Werkzeugen geforscht werden. Mittlerweile ist neben der humanen FcRn Substitutionsmaus auch eine FcRn *knock-out* Maus erhältlich, die auch in anderen Arbeiten bisher kaum zu Einsatz kam. Vorher gilt es allerdings noch zu klären, ob die *in vitro* ausgeschlossene Bindung von HSA an den FcRn der Maus *in vivo* ebenfalls nicht vorhanden ist. Dieses wäre mit einer *knock-out* Maus eindeutig nachweisbar und würde diese als Referenztier zur humanen FcRn Substitutionsmaus obsolet machen, da als Referenz für diesen Fall eine Wildtyp Maus ebenfalls geeignet wäre.

Neben Tierversuchen als Instrument eines *in vivo* Nachweises gilt es zunächst die bioinformatischen Methoden zu verfeinern; das Vorgehen und die dadurch ermittelten Bindestellen unterscheiden sich unter den an dieser Thematik arbeitenden Arbeitsgruppen erheblich. Präzisere Prognosen für potentielle Bindestellen erlaubten gezieltere Mutagenesen und damit einen drastisch erhöhten Durchsatz an zu testenden Albuminvarianten, wodurch auch die Anzahl von Tierversuchen minimiert werden könnten. In Tieren würden abgeleitet von den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nur solche Mutanten getestet werden müssen, die im SPR vom Wildtyp Albumin abweichende Bindungseigenschaften zum FcRn aufwiesen.

Weiteres Verbesserungspotential könnte die Expressionsteigerung von rekombinanten Albuminen, möglicherweise auch durch andere Expressionssysteme darstellen, zum Beispiel Hefen (Sleep D. 1990). Durch die Möglichkeit größere Mengen Protein für Versuche zur Verfügung zu stellen, eröffnen sich andere Methoden. So könnte z. B. die Bindung noch zusätzlich durch isotherme Titrationskalorimetrie charakterisiert werden



und die rekombinanten Albumine mittels Röntgenstrukturanalyse auf ihre dem Wildtyp entsprechende Tertiärstruktur untersucht werden.

Die Aussicht auf ein Albumin mit verlängerter Halbwertszeit als Fusionspartner für therapeutische Proteine ist mit dieser Arbeit einen Schritt näher gerückt.

## 5 Zusammenfassung

Ausgehend von der bereits bekannten Bindung des FcRn an die dritte Domäne von Albumin und einer Prognose über die Bindestelle im Albumin von Seiten des „*Molecular modelings*“, konnte diese auf zwei Aminosäuren eingeschränkt und einen Bezug dieser zur Halbwertszeit von Albumin hergestellt werden. Durch die Herstellung dieses Bezuges wurde ein starkes Indiz für einen zuvor in der Literatur (Chaudhury C 2003) postulierten Recyclingmechanismus von Albumin durch den FcRn gewonnen.

Der Bestimmung dieser Bindestelle gingen die Herstellung von dreizehn gentechnisch veränderten Varianten des humanen Albumins und des humanen FcRn als lösliches Protein voraus. Zur Analyse der Bindung zwischen den Albuminvarianten und dem FcRn wurde ein Bindungstest über das Prinzip der *surface plasmon resonance* etabliert und erfolgreich eingesetzt. Um einen Bezug zur der Halbwertszeit der Albumine im Blut herzustellen, wurden diese im Vergleich zum Albumin-Wildtyp Ratten appliziert und Abbaukinetiken erstellt. Das durch SPR charakterisierte Bindeverhalten der Albuminvarianten zum FcRn *in vitro* konnte so mit deren Abbau *in vivo* verglichen und ein Verhältnis zwischen der Bindung an den FcRn und der Halbwertszeit hergestellt werden.

Das Ergebnis dieser Arbeit besteht in der Einschränkung einer Bindestelle des Albumins zum FcRn auf zwei Aminosäuren und der Beweis, dass diese einen Einfluss auf die Halbwertszeit von Albumin im Blut haben. Damit ist die Untersuchung der Bindung zwischen dem FcRn und Albumin einen wichtigen Schritt voran gekommen und das Ziel eines halbwertszeitverlängerten Albumins zur Fusion mit therapeutischen Proteinen einen Schritt näher gerückt.

## 6 Literaturverzeichnis

**Adkins S.**, Burmeister M., „Visualization of DNA in agarose gels as migrating colored bands: applications for preparative gels.“ *Analytical Biochemistry* Vol. 240, 1996: 17-23.

**Ancell, H.** „Course of lectures on the physiology and pathology of the blood and other animal fluids.“ *Lancet*, 1839: 222.

**Andersen C.L.**, Chaudhury C., Jonghan K., bronson C.L., Manzoor A. Sudhasri M. „Perspective – FcRn transports albumin:relevance to immunology and medicine.“ *Trends in Immunology*, 2006: 333-348.

**Andersen J. T.**, et al. „Cross-Species binding analyses of mouse and human FcRn show dramatic differences in IgG and albumin binding.“ *The J. of Biol Chem*, 2009: S 1-25.

**Andersen J. T.**, Jutesen S, Berntzen G., Michaelsen T. E., Lauvrak V., Fleckenstein B., Buus S., Sandlie I., „A strategy for bacterial production of a soluble functional human neonatal Fc receptor.“ *Journal of Immunological Methods*, 2008: 39-49.

**Andersen J. T.**, Justesen S., Fleckenstein B., Michaelsen T.E., Berntzen G., Kenanova V. E., Daba m. B., Lauvrak V., Buss S., Sandlie I. „Ligand binding and antigenic properties of a human neonatal Fc receptor with mutation of two unpaired cysteine residues.“ *FEBS Journal*, 2008: 4097-4110.

**Andersen J. T.**, Qian J, Sandlie I. „The conserved histidine 166 residue of the human neonatal Fc receptor heavy chain is critical for the pH-dependent binding to albumin.“ *Biochemistry* Vol. 36, 2006: 3044-3051.

**Arber W.**, Dussoixa Daisy. „Host specificity of DNA produced by Escherichia coli: I. Host controlled modification of bacteriophage  $\lambda$  .“ *Journal of Molecular Biology* Vol 5, 1962: 18-36.

**Avery OT.**, Colin M, MacLeod und Maclyn McCarty. „Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. .“ *Journal of Experimental Medicine* Vol. 79, 1944: 137–158.

**Ballabh, P.**, Braun, A. & Nedergaard, M. „The blood–brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications, 1–13 (2004).“ *Neurobiol. Dis.* Vol. 16, 2004: 1-13.

**Behrens PG.**, Spiekerman AM., Brown JR. „Structure of human serum albumin.“ *Fed. Lett.* 58, 1975: 659-661.

**Bertani G.** „Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*.“ *J. Bacteriol.* Vol. 62, 1951: 293-300.

**Bolivar F.**, Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heyneker HL, Boyer HW, Crosa JH, Falkow S. „Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system.“ *Gene* Vol. 2, 1977: 95-113.

**Borvak, J.** et al. „Functional expression of the MHC class I-related receptor, FcRn, in endothelial cells of mice. .“ *Int. Immunol.* Vol. 10, 1998: 1289–1298.

**Brambell F.** *The Transmission of Passive Immunity from mother to Young.* North Holland Publishing Company, 1970.

**Brown JR.** „Structure of bovine serum albumin.“ *Fed. Proc.* 34, 1975: 591.

**Burmeister W.**, Louis N. Gastinel, Neil E. Simister, Michael L. Blum & Pamela J. Bjorkman. „Crystal structure at 2.2 Å resolution of the MHC-related neonatal Fc receptor.“ *Nature* Vol. 372, 1994: 336 - 343.

**Chaudhury C.**, Roopenian D. C, Anderson C L,. „The Major Histocompatibility Complex-related Fc Receptor for IgG (FcRn) bind Albumin and Prolongs its Lifespan.“ *The Journal of Experimental Medicine*, 2003: 315-322.

**Chaudhury C.**, Brooks C, Carter D, Robinson J, Anderson C. „Albumin Binding to FcRn: Distinct from the FcRn-IgG Interaction.“ *Biochemistry*, 2006: 45 4983-4990.

**Chelly J.**, J P Concordet, J C Kaplan, and A Kahn. „Illegitimate transcription: transcription of any gene in any cell type.“ *PNAS Vol. 86*, 1989: 2617-2621.

**Chmiel H.** *Bioprozesstechnik*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2005.

**Don RH.**, Cox, B J Wainwright, K Baker, and J S Mattick. „'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification.“ *Nucleic Acids Res Vol. 19*, 1991: 4008.

**Dumont, J. A.** et al. „Delivery of an erythropoietin–Fc fusion protein by inhalation in humans through an immunoglobulin transport pathway.“ *J. Aerosol Med. Vol. 18* , 2005: 294–303.

**Edwards P.**, Leatherbarrow R. „Determination of Association Rate Constants by an Optical Biosensor Using Initial Rate Analysis.“ *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY 246*, 1997: 1-6.

**Edwin J. Cohn**, John L. Oncley, Laurence E. Strong, Walter L. Hughes, Jr., and S. Howard Armstrong. „Chemical, Clinical and immunological studies on the products of human plasma fractionation. The characterization of the protein fractions of human plasma.“ *J. of clinical Invest.*, 1944: Vol 23 S 417-432.

**Ehrlich P.** „Bemerkungen über die Immunität durch Vererbung und Säugung.“ *Deutsche medizinische Wochenschrift 18*, 1892: 511.

**Engvall E.**, Perlmann P. „Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G.“ *Immunochemistry Vol. 8*, 1971: 871-874.

**Escherich T.** *Die Darmbakterien des Säuglings und ihre Beziehungen zur Physiologie der Verdauung*. Stuttgart: F. Enke, 1886.

**Flückinger N.**, Iberg R. „Nonenzymatic glycosylation of albumin in vivo. Identification of multiple glycosylated sites.“ *Journal of Biological Chemistry*, 1986: Vol 261, S 13542-13545.

**Freeman T.**, Gordon A. H. „Albumin catabolism in hypoproteinaemic states studies with I-Albumin.“ *Bibl. Haematol.*, 1965: 1108-1115.

**Gastinel L. N.**, Simister N.E., Bjorkman P.J., „Expression and crystallization of a soluble and functional form of an Fc receptor related to class I histocompatibility molecules.“ *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992: 638-642.

**GE-Healthcare.** *Biacore Sensor Surface Handbook*. Freiburg, 2008.

**Ghetie, V. & Ward, E. S.** „Multiple roles for the major histocompatibility complex class I-related receptor FcRn.“ *Annu. Rev. Immunol. Vol. 18*, 2000: 739-766.

**Greenfield NJ.** „Methods to Estimate the Confrontation of Proteins and Polypeptides from Circular Dichroism Data.“ *Analytical Biochemistry*, 1996: 1-10.

**Haeberli A.**, Peters Theodore jr. *Human Protein Data*. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1992.

**Hofmann K.** *Bioinformatik Bericht - Verbesserung der FcRn-Bindung von Albumin*. Köln: Miltenyi Biotec GmbH, 2009.

**Hofmann K.** *Bioinformatik Bericht - Vorhersage der FcRn-Bindungsstelle von Albumin*. Köln: Miltenyi Biotec GmbH, 2007.

**Israel E. J.**, Wilkser D.F., Hayes K. C., Schoenfeld D., Simister N. E. „Increased clearance of IgG in mice that lack beta 2microglobulin: possible protective role of FcRn.“ *Immunology Vol. 89*, 1996: 573-578.

**Jagodzynski LL.**, Sargent TD., Yang M., et al. „Sequence homology between RNAs encoding rat alpha-fetoprotein and rat serum albumin.“ *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78*, 1981: 3521-3525.

**Jerker P.**, Jan Carlsson, lingmar Olsson,. „Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation.“ *Nature Vol. 258*, 1975: 598-599.

**Jones, E. A.** and Waldmann, T. A. „The mechanism of intestinal uptake and transcellular transport of IgG in the neonatal rat.“ *J. Clin. Invest. Vol. 51*, 1972: 2916–2927.

**Kelly Sharon M.**, Price Nicholas,. „The use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure and Function.“ *Current protein and Peptide Science*, 2000: 349-384.

**Kelly SM.**, Price NC. „The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function.“ *Curr. Protein Pept. Sci, Vol. 1*, 2000: 349-384.

**Kenanova V. E.**, et al. „Tuning the serum persistence of human serum albumin domain III: diabody fusion proteins.“ *Protein Engineering Design & Selection Vol 23*, 2010: S. 789798.

**Klenchin .A.**, und Sukharev SI, und Serov, S.M. und Chernomordik, S.V. und Chizmadzhev, Yu.A. „Electrically induced DNA uptake by cells is a fast process involving DNA electrophoresis .“ *Biophys J. Bd. 60*, 1991: 804–811.

**Klenow H.**, Henningsen. „ Selective elimination of the exonuclease activity of the deoxyribonucleic acid polymerase from Escherichia coli B by limited proteolysis.“ *PNAS Vol. 65*, 1970: 168-175.

**Kleppe K.**, et al. „Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNAs as catalyzed by DNA polymerases.“ *J. Mol. Biol. Bd. 56*, 1971: S. 341–361.

**Kragh-Hansen U.** „Molecular aspects of ligand binding to serum albumin.“ *Pharm. Rev. 33*, 1981: 17-53.

**Kristoffersen, E. K.** „Human placental Fc  $\gamma$ -binding proteins in the maternofetal transfer of IgG.“ *APMIS Suppl. Vol 64*, 1996: 5–36.

**Laemmli, U. K.** „Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.“ *Nature*, 1970: 580-685.

**Langguth P.**, Fricker G., Wunderli-Allenspach H. „Biopharmazie.“ Von Fricker G., Wunderli-Allenspach H Langguth P., 83-85 u. 235-237. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2004.

**Leach, J. L.** et al. „Isolation from human placenta of the IgG transporter, FcRn, and localization to the syncytiotrophoblast: implications for maternal–fetal antibody transport.“ *J. Immunol. Vol. 157*, 1996: 3317–3322.

**Lilin Ye**, Wenbin Tuo, Xindong Liu, Neil E. Simister, Xiaping Zhu. „Identification and characterization of an alternatively spliced variant of the MHC class I-related porcine neonatal Fc receptor for IgG.“ *Developmental and Comparative Immunology*, 2008: 966-979.

**Low, S. C.**, Nunes, S. L., Bitonti, A. J. & Dumont, J. A. „Oral and pulmonary delivery of FSH–Fc fusion proteins via neonatal Fc receptor-mediated transcytosis.“ *Hum. Reprod. Vol. 20*, 2005: 1805–1813.

**MacKay ME.**, Martin NH.,. „The stabilization of purified human albumin to heat.“ *Biochem J. Vol 65*, 1957: 284-288.

**May F.**, Westley Br., Wyler T., et al.,. „Structure and evolution of the *Xenopus laevis* albumin genes.“ *J. Molec. Biol. 168*, 1983: 229-249.

**Mazumar S.** „Surface plasmon resonance (SPR) biosensor for rapid detection of Salmonella and Salmonella infections.“ *Dissertation im Fachbereich Pharmazie, der Philipps-Universität Marburg*, 2008: 86-88.

**Mc Lachlan AD.**, Walker JE.,. „Evolution of serum albumin.“ *Molec. Biol. 112*, 1977: 543-558.



**McOrist AL.**, Jackson M, Bird AR,. „A comparison of five methods for extraction of bacterial DNA from human faecal samples.“ *J Microbiol Methods*. Vol 50, 2002: 131-139.

**Meloun B.**, MoravekL, Kostka V. „Complete amino acid sequence of human serum albumin.“ *FEBS Lett*.58, 1975: 134-137.

**Metzner H J.**, Weimer T., KronthalerU., Lang W., Schulte S,. „Genetic fusion to albumin improves the pharmacokinetic properties of factor IX.“ *Thromb Haemost*. Vol 102, 2009: 634-644.

**Neurath H.**, Bailey k,. „Intestinal Proteins: The Proteins of blood plasma and lymph.“ *The proteins* Vol. 2, 1954: 663-755.

**Nicholson J. P.**, Wolmarans M.R. , Park G. R. „The role of albumin in critical illness.“ *British Journal of Anaesthesia* Vol 85, 2000: 599-610.

**Ohno S.** „Original domain for the serum albumin family arose from repeated sequences.“ *Proc Natl Acad Sci USA* 78, 1981: 7657-7661.

**Osborn B.L.**, et al. „Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Studies of a Human Serum Albumin-Interferon-alpha Fusion Protein in Cynomolgus Monkeys.“ *The J. of pharm. and exp. Therapeutics* Vol. 303, No. 2, 2002: 540-548.

**Peters Jr. T.** „Serum albumin.“ *Advances in protein chemistry* Vol 37, 1985: 161-245.

**Peters T.**, Anfinsen CB,. „Net production of serum albumin by liver slices.“ *J. of Biochem.*, 1950: Vol. 86 S. 805-813.

**Peters TJ.** *The Metabolism:albumin in the body. In: All About Albumin. Biochemistry, Genetics and Medical Applications.* San Diego: Academic Press, 1996.

**Plumridge A.**, Sleep Darrell, Cameron Jason, Sandlie Inger, Anderese Jan Terje, Friis Ebsen Peter. International Publication Patent WO 2011/051489 A2. 2011.

**Puck TT.**, Cieciura S J, Robinson A., „Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects.“ *J. Exp. Med Vol. 108*, 1958: 945-956.

**Raghavan M.**, Bonagura V., Morrison S., Bjorkman P. „Analysis of the Dependence of the Neonatal Fc Receptor/Immunglobulin G Interaction Using Antibody and Receptor Variants.“ *Biochemistry Vol. 34*, 1995: 14649-14657.

**Roopenian D. C.**, Akilesh S. „FcRn: teh neonatal Fc receptor comes of age.“ *Nature Reviews, Immunology Vol. 7*, 2007 : S. 715-725.

**Roopenian D. C.**, Gregory J. Christianson, Thomas J. Sproule, Aaron C. Brown, Shreeram Akilesh, Nadja Jung, Stefka Petkova, Lia Avanesian, Eun YOung CHoi, Daniel J. Schaffer, Peter A. Eden, and Clark L. Anderson. „The MHC Class I-Like IgG Receptor Controls Perinatal IgG Transport, IgG Homeostasis, and Fate of IgG-Fc-Coupled Drugs.“ *The Journal of Immunology*, 2003: 3528-3533.

**Rosenoer VM.**, Oratz M., Rothschild MA.,. „Albumin structure, function and uses.“ 27-51. New York: Pergamon Press, 1977.

**Saiki RK.**, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. „Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.“ *Science Vol. 230*, 1985: 1350-1354.

**Sanger F.**, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, Hutchison CA, Slocombe PM, Smith M. „ Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA.“ *Nature Vol. 265*, 1977: 687–695.

**Sargent TD.**, Jagodzinski LL., Yang M., et al. „Fine structure and evolution of the rat serum albumin gene. 1.“ *Molec Cell Biol.*, 1981: 871-883.

**Schnitzer JE.**, Bravo J.,. „High affinity binding, endocytosis and degradation of conformationally modified albumins.“ *J. Biol. Chem. Vol. 268*, 1993: 7562-70.

**Schulte S.** „Half-life extension through albumin fusion technologies.“ *Thrombosis Research* 124 Suppl. 2, 2009: s. 6-8.

**Schultze H. E.,** Heremans J. F. *Molecular Biology of human Proteins: with Special Reference to Plasma Proteins Vol.1 Nature and Metabolism of of Extracellular Proteins* . Elsevier, 1966.

**Shuman S.** „Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase.“ *J Biol Chem. Vol. 269*, 1994: 32678-32684.

**Simister, N. E.,** Rees A R.,. „Isolation and characterization of a neonatal Fc receptor from neonatal rat.“ *Eur J. of Immunol. Vol.15*, 1985: 733-738.

**Simister, N. E.,** Story, C. M., Chen, H. L. & Hunt, J. S. „An IgG-transporting Fc receptor expressed in the syncytiotrophoblast of human placenta.“ *Eur. J. Immunol. Vol. 26*, 1996: 1527–1531.

**Singh V.** „Disposable bioreactor for cell culture using wave-induced agitation.“ *Cytotechnology Vol 30*, 1999: 149-158.

**Sleep D.,** G. P. Belfield & A. R. Goodey. „The Secretion of Human Serum Albumin from the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Using Five Different Leader Sequences.“ *Nature Biotechnology Vol 8*, 1990: S 42-46.

**Strober,** Mariani G. adn. „Immunoglobulin metabolism. In Fc receptors and the action of antibodies.“ *Am Soc. Microbiol*, 1990: 94-180.

**Sugio S.,** Kashima A, Mochizuki S., Noda M., Kobayashi K. „Crystal Structure of Human Serum Albumin.“ *Protein Eng, Vol 12*, 1999: S. 439-446 .

**Towbin H.,** Staehelin T, Gordon J.,. „Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.“ *PNAS Vol. 76*, 1979: 4350-4354.

**Vallner JJ.** „Binding of drugs by albumin and plasma protein.“ *J. Pharm Sci* 66, 1977: 447-465.

**Vaughn, D. E.** & Bjorkman. „P. J. Structural basis of pH-dependent antibody binding by the neonatal Fc receptor.“ *Structure Vol. 6* , 1998: 63–73.

**Vaughn, D. E.** et al. „Identification of critical IgG binding epitopes on the neonatal Fc receptor.“ *J. Mol. Biol. Vol. 274*, 1997: 597-607.

**Waldmann T.A,** Strober W.,. „Metabolism of immunoglobulins.“ *Prog. Allergy Vo.l 13*, 1969: 1-110.

**Ward, E. S.,** Zhou, J., Ghetie, V. & Ober, R. J. „Evidence to support the cellular mechanism involved in serum IgG homeostasis in humans. .“ *Int. Immunol. Vol. 15*, 2003: 187–195 .

**Weimer T.,** Wilfried Wormsbächer, Ulrich Kronthaler, Wiegand Lang, Uwe Liebing, Stefan Schulte. „Prolonged in-vivo half-life of factor VIIa by fusion to albumin.“ *Thromb Haemost Vol. 99*, 2008: s. 659–667.

**Weiner MP.,** GL. Costa. „Rapid PCR site-directed mutagenesis.“ *Genome Res. Vol 4* , 1994: 131-S136.

**Weiss B.,** Richardson CC ,. „"Enzymatic Breakage and Joining of Deoxyribonucleic Acid, I. Repair of Single-Strand Breaks in DNA by an Enzyme System from Escherichia coli Infected with T4 Bacteriophage".“ *PNAS Vol. 57*, 1967: 1021-1008.

**West. A.P.,** Bjorkman P.,. „Crystal Structure an immunoglobulin G Binding Properties of the Human Major Histocompatibility Complex-Related Fc Receptor.“ *Biochemistry*, 2000: 9698-9708.

**Wood M.** „Plasma drug binding: implications for anesthesiologists.“ *Anesth. Anal. 65*, 1986: 786-804.

**Wurm F.** „Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells.“ *Nat. Biotechnol.* Vol. 22, 2004: 1393-1398.

**Xiao Min He,** and Daniel C. Carter. „Atomic structure and chemistry of human serum albumin.“ *Nature*, 1992: Vol 358,S. 209 - 215 .

**Yedgar S.,** Carew TE, Pittman RC, Beltz WF, Steinberg D. „Tissue of catabolism of albumin in rabbits.“ *Am J. Physiol.*, 1983: Vol 244 S. 101-107.

**zur Hausen H.** „ Induction of specific chromosomal aberrations by Adenovirus Typ 12 in human embryonic kidney cells .“ *Journal of Virology* Vol. 6, 1967: 1174-1185 .

## 7 Anhang

### 7.1 Verwendete Chemikalien, Geräte und Materialien.

#### 7.1.1 Material zur Durchführung einer Polymerasekettenreaktion

Template-Material	<ul style="list-style-type: none"><li>• 10-20 ng Plasmid DNA</li><li>• 1-2 µl human liver cDNA Bank (entspricht 0,5-1,0 ng), Fa Ambion</li><li>• 1,0 ng DNA Amplifikat aus PCR oder nested-PCR</li></ul>
Thermocycler	Gene Amp PCR System 9700, Fa PE Applied Biosystems
eingesetzte Polymerasen	<ul style="list-style-type: none"><li>• Taq-Polymerase, aus <i>Thermophilus aquaticus</i>, wurde für A-Tailing und kurze Amplikons eingesetzt Perfect Taq DNA Polymerase 1 U/µl, Fa 5Prime</li><li>• Pfu Ultra-Polymerase, aus <i>Pyrococcus furiosus</i>, mit <i>proof reading</i> Funktion, die eine geringere Fehlerwahrscheinlichkeit garantierte, wurde für die Klonierung rekombinanter Plasmide benutzt Pfu Ultra High Fidelity DNA Polymerase 2,5U/µl, Fa Stratagene</li><li>• Phusion-Polymerase, eine rekombinante, fusionierte Polymerase aus einer <i>Pyrococcus furiosus</i> ähnlichen Polymerase und einer DNA Bindungsdomäne Phusion High-Fidelity DNA Polymerase, 2 U/µl, Fa Finnzymes</li></ul>
Pufferlösungen	<ul style="list-style-type: none"><li>• 10 x PCR Buffer, Fa 5Prime</li><li>• 10 x Pfu Ultra Puffer, Fa Stratagene</li><li>• Phusion Puffer (5 x GC Puffer für GC reiches</li></ul>

	Ausgangsmaterial; 5 x HF Puffer für normalverteilte Nukleotide im Amplifikationsbereich), Fa New England Biolabs
Nukleotide	dNTP Mix liegt den jeweiligen Polymerasen bei
Primer	(8.2 Verwendete Primer / Oligonukleotidliste), Fa Operon die eingesetzte Primermenge betrug 10 pmol
Ansatzvolumen	ad 50 µl H <sub>2</sub> O Water PCR Reagent, Fa Sigma
Berechnung der T <sub>M</sub> :	$T_M = (A + T) \times 2 \text{ °C} + (G + C) \times 4 \text{ °C}$
PCR:	$T_A = T_M - 5 \text{ °C}$
Touchdown PCR	$T_A = T_M - 5 \text{ °C} + 2 \text{ °C}$ $T_M$ = melting temperature (sollte zwischen 55 °C und 64 °C liegen; ab dieser Temperatur lösen sich die Primer wieder von der <i>template</i> -DNA) (A + T) = Anzahl der Nukleinsäuren Desoxyadenosin/-thymidin (G + C) = Anzahl der Nukleinsäuren Desoxyguanosin/-cytidin

### 7.1.2 Material zur Durchführung einer Mutagenese

Template-Material	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 10-20 ng Plasmid DNA</li> <li>• 1-2 µl human liver cDNA Bank (entspricht 0,5-1 ng), Fa Ambion</li> <li>• 1 ng DNA Amplifikat aus PCR oder nested-PCR</li> </ul>
Thermocycler	Gene Amp PCR System 9700, Fa PE Applied Biosystems
Primer	(Verwendete Primer / Oligonukleotidliste), Fa Operon: die eingesetzte Menge betrug 10 pmol Die Primer sollten zwischen 25 und 45 <i>basepairs</i> (bp) lang sein und einen GC Gehalt von mindestens 40 % aufweisen. Die T <sub>M</sub> sollte ≥ 78 °C betragen
Mutagenese Kit	Quick Change II XL Site-Directed, Fa Stratagene: Pfu Ultra High Fidelity polymerase (2,5 U/µl)

	10x Pfu Ultra Puffer
	QuikSolution reagent
	dNTP Mix
	Dpn I (10 U/μl)
	Water PCR Reagent, Fa Sigma ad 50 μl
Berechnung der $T_M$	$T_M = 81,5\text{ °C} + (0,41 \times (\%GC) \times 1\text{ °C}) - (675 \times 1\text{ °C}) / N - (\%missmatch \times 1\text{ °C})$ <p> <math>T_M</math> = melting temperature sollte <math>\geq 78\text{ °C}</math> betragen            (%GC) = prozentualer Anteil der Nukleinsäuren            Desoxyguanosin/-cytidin, bezogen auf alle Nukleinsäuren des betroffenen Abschnitts            N = Anzahl aller Nukleotide            % mismatch = prozentualer Anteil der Nukleinsäuren im Primer, welche nicht mit der template-DNA binden         </p>
Kompetente Zellen	XL10-Gold Ultracompetent cells, Fa Stratagene

### 7.1.3 Material zur Durchführung von Agarosegelelektrophoresen

Netzteil	2301 Macrodrive Power Supply, Fa LKB Bromma
Gelkammer	Gelkammer für 20 x 30 cm Gele, Fa Renner GmbH
Geldokumentationseinheit	Image Master VDS, Fa Pharmacia Biotech
Gel	LE Genetic Pure, Fa Biozym
Probenpuffer/Stopmix	2 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 25 mg Bromphenol Blau, Fa Sigma 25 mg Xylene Cyanol, Fa Sigma 2 g Saccharose, Fa Roth ad 10 ml H <sub>2</sub> O
Ethidiumbromidstammlösung	Ethidiumbromid, Fa Roth: Färbekonzentration im Wasserbad: 50 ng/ml Färbedauer: 15-25 min
Reinstwasser (Milli-Q®)	hergestellt mit: Millipore Advantage A10 Anlage, Fa. Millipore
SB-Puffer	Stammlösung:



	0,25 M Natriumhydroxid
	0,25 M Natriumborat Decahydrat
	pH 8,0
	Arbeitslösung:
	Die Stammlösung wurde mit Milli-Q®-Wasser (H <sub>2</sub> O) 1/25-fach verdünnt.
1 kb Marker	1 kb ladder 500 µg/ml, Fa New England BioLabs:
	Ansatz:
	250 µl 1 kb ladder
	3250 µl H <sub>2</sub> O
	500 µl Stopmix

#### 7.1.4 Material zur Durchführung anderer Gentechnischer Arbeiten

Gelextraktionskit	QIAquick® Spin Kit, Fa Qiagen:
	QG-Puffer, Guanidinthiocyanat
	PE-Puffer, Ethanolpuffer
Elutionslösung	Water PCR Reagent, Fa Sigma
PCR Reinigungskit	QIAquick® PCR Purification Kit, Fa Qiagen:
	PB Buffer enthält Guanidin HCl und Isopropanol
	PE Buffer, Ethanolpuffer
	Silikasäulen
Ligase	T4 DNA Ligase 1 U / µl, Fa Invitrogen
Ligase Puffer	5 x DNA Ligase Reaction Buffer, Fa Invitrogen:
	50 mM MgCl <sub>2</sub>
	5 mM ATP
	5 mM DTT
	25 % ( m / V ) Polyethylenglykol-8000

E.coli Zellen zur Transformation nach Ligation	<p>One Shot® TOP10, Fa Invitrogen</p> <p>Die E.coli Zellen One Shot® TOP10 wurden zur Amplifikation von PCR Fragmenten benutzt, die durch A-Tailing in ein TA-Vektor gesetzt worden sind (TA-Cloning® Kit, Fa Invitrogen).</p> <p>Der Genotyp wird wie folgt beschrieben: F- mcrA <math>\Delta</math>(mrr-hsdRMS-mcrBC) <math>\phi</math>80lacZ<math>\Delta</math>M15 <math>\Delta</math>lacX74 recA1 araD139 <math>\Delta</math>(araleu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG</p>
E.coli Zellen zur Transformation nach Mutagenese	<p>XL1 Blue MRF', Fa Stratagene</p> <p>Zur Amplifikation von mutierten Plasmiden wurde der E.coli Stamm XL1 Blue MRF' (Fa Stratagene) eingesetzt.</p> <p>Der Genotyp wird wie folgt beschrieben: <math>\Delta</math>(mcrA)183 <math>\Delta</math>(mrcCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac[F'proABlacIq Z<math>\Delta</math>M15 Tn10(Tetr)]</p>
Glukosemedium	<p>SOC Medium, Fa Invitrogen:</p> <p>2 % Trypton</p> <p>0,5 % Hefe Extrakt</p> <p>10 mM Natriumchlorid</p> <p>2,5 mM Kaliumchlorid</p> <p>10 mM Magnesiumchlorid</p> <p>10 mM Magnesiumsulfat</p> <p>20 mM Glukose</p>
Petrischalen	Petrischalen, Fa Gibco
Selektionsmarker	<p>AmpTabs 25mg/Tab Fa Stratagene: eingesetzte Konzentration 100mg/l</p>
Brutschrank	Typ B5042, Fa Heraeus
Agar-Agar	Agar-Agar technisch, Fa Merck
Zellkulturmedium	LB Broth-Medium, Fa Gibco
Plasmidreinigungskit	<p>QIAprep® Kit, Fa Qiagen:</p> <p>P1 Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A)</p> <p>P2 Puffer (200 mM NaOH, 1% ( m / V ) SDS)</p> <p>PE Puffer (enthält EtOH)</p>

	N3 Puffer (enthält Guanidinhydrochlorid und Isopropanol)
UV-Photometer	Du530 Life Science UV/Vis Spectrophotometer, Fa Beckman
Zellinkubator	Minitron, Fa Infros Umdrehungszahl: 230 U/min Temperatur: 37 °C Inkubationszeit: 14-16 h
Software	Megalign, Fa DNASTar EditSeq, Fa DNASTar SequMan, Fa DNASTar Clonemanager, Fa Lasergene
Sequencer	ABI 3730XL 96-capillary sequencers, sequencing kit: BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-2500, Fa Applied Biosystems
Sequenzieroligonukleotide	pCR4: M13 uni, M13 rev, Fa Medigenomix pIRES:2666, 2667 Fa Medigenomix

### 7.1.5 Material zur Durchführung Zellkulturtechnischer Arbeiten

HEK293-Medium	Freestyle 293 SFM, Fa Gibco
CHO-Medien	ProCHO5 , Lonza AG
Accutase	Accutase, Fa Sigma 5 ml, 5 min RT, um adhärenente Zellen zu lösen und sie später auf die gewünschte Zelldichte mit konditioniertem Zellkulturüberstand einstellen zu können
Lipofektamin	Lipofektamin 2000 CD Reagent, Fa Gibco: 4 µl/Ansatz
Plasmid DNA	2 – 4 µg Plasmid DNA pro Ansatz, 5 h mit 4 µl Lipofektamin und 100 µl HEK293-Medium inkubieren
Elektroporationsaparatur	Amaya™ Nucleofector Kit, Lonza AG
Laborzentrifuge	Cryofuge, Fa Heraeus

Tiefenfilter für Zellabtrennung	Kleenpak Nova (0,64 µm → 0,2 µm), Fa Pall
ph-Sonde	Easyferm Plus K8 425, Fa Hamilton
O2-Sonde	Oxyferm FDA 425, Fa Hamilton
Zellanalysator, zur offline Analyse	Bioprofile® Flex, Fa Novabiomedical (Counter, pH extern, Metaboliten etc.)
Fermentersteuerung	BioStat B-DCU, Fa Sartorius
Glasfermentergefäße	10 l Glasfermenter mit Doppelwand, Fa Sartorius
Primärzellen HEK293	ATCC Number: CRL-1573
Primärzellen CHO	ATCC Number: CCL-61
Inkubationsplatten (6, 12 well Platten)	Multidishes Non-treated, Fa Nunc
Selektionsantibiotikum	Puromycin / Neomycin Fa InvivoGen: Eingesetzte Konzentration: 4 µg/ml
Einmalpipetten	Sterile Einmalpipetten: 1; 2; 5, 10 und 25 ml, Fa Nunc
Zentrifugenröhrchen	Zentrifugenröhrchen (steril), 14 ml, Polystyrol (17 x 100 mm) mit Schnapp-Deckel, Fa Becton Dickinson
	Zentrifugenröhrchen (steril), 50 ml, Polypropylen (30 x 115 mm) mit Schraubdeckel, Fa Greiner
Einfrierröhrchen	Einfrier (Kryo)-Röhrchen 2 ml, Fa Greiner
Sicherheitswerkbank	Sicherheitswerkbänke der Klasse 2:  BDK-S 1200, Typ UVF 6.12S, Fa BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH  UVF 6.18.S, Fa BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH
Laborzentrifuge	Megafuge 1.0, Fa Heraeus Labofuge GL, Fa Thermo Electron
Kryo-Einfriergerät	Freezing Container, Fa Nalgene
Dimethylsulfoxid	DMSO, Fa Sigma

### 7.1.6 Material zur Durchführung von Proteinaufreinigungen

Anti-Albumin-Säule	monoklonaler anti-human Albumin Antikörper: MAK3E8lia, Fa CSL Behring Sepharose™ 4 Fast Flow - gebunden, Fa GE
Anti-Albumin-Äquilibrierpuffer	20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 100 mM NaCl pH 7,0
Anti-Albumin-Waschpuffer 1	20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1 M NaCl 2 mM Na-Caprylat pH 7,0
Anti-Albumin-Waschpuffer 2	20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2 mM Na-Caprylat pH 7,0
Anti-Albumin-Elutionspuffer	0,1 M Glycin pH 2,5
Anti-Albumin-Vorlagepuffer	1 M Tris 1 M NaCl 20 mM Na-Caprylat pH 9,0
Nickel-NTA	Ni Sepharose™ 6 Fast Flow, Fa GE
Nickel-NTA-Waschpuffer	20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,5 M NaCl, 30 mM Imidazol, pH 7,4
Nickel-NTA-Elutionspuffer	20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,5 M NaCl 0,5 M Imidazol pH 7,4
Chromatographieanlage	Äkta™ explorer, Fa GE
alle Chemikalien wurden von der Fa Merck Reinheitsgrad p.a. bezogen;	

### 7.1.1 Material zur Proteinanalytik

#### 7.1.1.1 SDS-PAGE

Gele	NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris Gel 1.0mm NuPAGE® Novex 10% Bis-Tris Gel 1.0mm
Laufpuffer	NuPAGE® MES / MOPS Running Buffer (20x)
Probenpuffer	NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x)
Reduzierungsagens	NuPAGE® Sample Reducing Agent (10x) (dt)
Standard	SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard
Elektrophorese/Bloteinheit	PowerEase® 500 Power Supply XCell SureLock™ Mini-Cell XCell II™ Blot Module
Färbereagenzien	SimplyBlue™ SafeStain SilverXpress® Kit

alle Produkte wurden von der Invitrogen AG bezogen

#### 7.1.1.2 SDS-PAGE Silberfärbereagenzien

Lösungen	Komponentenmischung
Fixing Solution	90 ml Milli-Q® H <sub>2</sub> O 100 ml Ethanol, Fa Merck 20 ml Eisessigsäure, Fa Merck
Sensitizing Solution	105 ml Milli-Q® H <sub>2</sub> O 100 ml Ethanol, Fa Merck 5 ml Sensitizer (Glutaraldehyd), Fa Invitrogen
Washing Solution	Milli-Q® H <sub>2</sub> O, Fa Millipore
Staining Solution	5 ml Stainer A (Silbernitrat), Fa Invitrogen 5 ml Stainer B (Ammoniumhydroxid und Natriumhydroxid), Fa Invitrogen

	90 ml Milli-Q® H2O
Washing Solution	Milli-Q® H2O
Developing Solution	95 ml Milli-Q® H2O 5 ml Developer (Formaldehyd und Zitronensäure), Fa Invitrogen
Stopping Solution	5 ml Stopper (Zitronensäure), Fa Invitrogen
Washing Solution	Milli-Q® H2O

### 7.1.1.3 Western Blotts

Transferpuffer	<ul style="list-style-type: none"> <li>• NuPAGE® Transfer Buffer (20x), Fa Invitrogen</li> <li>• Novex® Bis/Tris Transfer Buffer (20x), Fa Invitrogen</li> </ul>
Blotmembran	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nitrocellulose/Filter Paper Sandwich, 0,2 µm pore size, Fa Invitrogen</li> <li>• Invitrolon™ PVDF/Filter Paper Sandwich 0,45 µm pore size, Fa Invitrogen</li> </ul>
Blocklösung	Tris Buffered Saline, pH 8,0, with 3 % Nonfat Milk, Fa Sigma
Waschpuffer	Tris Buffered Saline, with Tween® 20, pH 8,0, Fa Sigma
Antikörper (Erst- und Zweitantikörper)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tetra His Antibody, BSA free Fa Qiagen</li> <li>• Penta His Antibody, BSA free Fa Qiagen</li> <li>• Penta His HRP Conjugate Kit Fa Qiagen</li> <li>• Anti Albumin polyclonal sheep, Fa. Abcam</li> <li>• Anti Mouse IgG, Alkaline Phosphatase, Fa Sigma</li> </ul>
Färbereagenz	Sigma Fast BCIP / NBT, Fa Sigma

#### 7.1.1.4 ELISA

- Verdünnungspuffer für Standard und Proben
- Verdünnungspuffer für Konjugat
- Mikrotiterplatten
- Beschichtungsmaterial
- Beschichtungspuffer
- Waschlösung
- Blocklösung
- Standard
- Konjugat
- Chromogen
- Puffer – Substrat (Verd.-Puffer für Chromogen)
- Stopplösung
- Plattenreader
- LowCross Buffer®, Fa Candor Bioscience GmbH
- siehe Blocklösung
- Nunc-Immuno Plate U96 Maxisorp, Fa Nunc
- Capture Antibody anti-hu Albumin A80-229A
- 0,5 mg/ml, Fa Bethyl:
- Gebrauchslösung: 2 µg/ml (1:250)
- 0,05 M Carbonat-Bicarbonat Buffer Capsules,
- Fa Sigma:
- PBS-T with Tween® 20, pH 7,4 , Fa Sigma
- Gebrauchslösung: 1 Beutel auf 1 Liter
- Blocking Solution, Fa Candor Bioscience GmbH
- N Protein Standard SL REF, Fa Dade Behring:
- Gebrauchslösung: 0,2 - 20 ng/ml
- Rabbit-anti-hu Albumin-POD 0,89 mg/ml, Fa Dako Gebrauchslösung: 1:9000 verdünnt
- Chromogen TMB, Fa Dade Behring:
- Gebrauchslösung: 1:11 verdünnt
- Puffer/Substrat TMB, Fa Dade Behring
- Stopplösung POD, Fa Dade Behring
- Behring Elisa Processor II, Fa Dade Behring



### 7.1.1.5 CD-Spektrenanalyse

Quarzküvette	110-QS 1 mm Fa. Hellma
CD-Spektropolarimeter	Spektropolarimeter J-810 Fa. Jasco

### 7.1.1.6 SPR

SPR-Gerät	Biacore 3000, Fa GE
Serum Albumin	Albumin 20 % ( m / V ), CSL Behring
Vivaglobin	Vivaglobin (Serum Immunglobulin Konzentrat) CSL Behring
Chip	Sensor Chip CM3, Fa GE
Chip-Aktivierungskit	<ul style="list-style-type: none"><li>• Amine Coupling Kit, Fa GE 750 mg EDC, 115 mg NHS, 10,5 ml 1 M ethanolamine-HCl pH 8,5</li><li>• BIA Maintenance Kit, Fa GE: BIA normalizing solution glycerol 70 % ( m / m ) BIAdesorb solution 1 BIAdesorb solution 2 BIA disinfectant HBS-EP buffer Sensor Chip Maintenance Sensor Chip System Check</li></ul>
Immobilisierungspuffer	Natriumacetatpuffer pH 4,0 / 4,5, Fa GE
Regenerierungspuffer	PBS pH 7,3/ Fa Sigma
Systempuffer 1	HBS-P Puffer, Fa GE: 0,01 M HEPES, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 0,005 % ( V / V ) Surfactant P20

#### **7.1.1.7 Material zu Tierversuchen**

Ratten	Rat, RccHan <sup>TM</sup> :WIST(SPF), Harlan Laboratories, B.V.
Zitratpuffer	3,31% Zitratlösung als Antikoagulanzen Fa Eifelfango

## 7.2 Bioinformatische Untersuchungen, Sequenzvergleich der dritten Albumin Domäne diverser Spezies

[illegible][illegible]

\* \* \* \* \*

hhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhh hhhhhhhhhhh hhhhhhhhh

ALBU HUMAN 235 EKAWEVARLSORFPKAEFAEVSKLVTDLTQVHTCECHGDLLECADDRADIAKYICENODSISSKIKECCEKPILEKSECIPEVENDEMPADLPSIADDFVESKDVCKNYPEAKDVFLGMF

ALBU PONPY 235 EKAWEVARLSORFPKAEFAEVSKLVTDLTQVHTCECHGDLLECADDRADIAKYICENODSISSKIKECCEKPILEKSECIPEVENDEMPADLPSIADDFVESKDVCKNYPEAKDVFLGMF

ALBU MACMU 235 EKAWEVARLSORFPKAEFAEVSKLVTDLTQVHTCECHGDLLECADDRADIAKYICENODSISSKIKECCEKPILEKSECIPEVENDEMPADLPSIADDFVESKDVCKNYPEAKDVFLGMF

ALBU FELCA 235 EKAWEVARLSORFPKAEFAEVSKLVTDLTQVHTCECHGDLLECADDRADIAKYICENODSISSKIKECCEKPILEKSECIPEVENDEMPADLPSIADDFVESKDVCKNYPEAKDVFLGMF

ALBU CANFA 235 EKAWEVARLSORFPKAEFAEVSKLVTDLTQVHTCECHGDLLECADDRADIAKYICENODSISSKIKECCEKPILEKSECIPEVENDEMPADLPSIADDFVESKDVCKNYPEAKDVFLGMF

ALBU MOUSE 235 EKAWEVARLSORFPKAEFAEVSKLVTDLTQVHTCECHGDLLECADDRADIAKYICENODSISSKIKECCEKPILEKSECIPEVENDEMPADLPSIADDFVESKDVCKNYPEAKDVFLGMF

ALBU RAT 235 EKAWEVARLSORFPKAEFAEVSKLVTDLTQVHTCECHGDLLECADDRADIAKYICENODSISSKIKECCEKPILEKSECIPEVENDEMPADLPSIADDFVESKDVCKNYPEAKDVFLGMF

ALBU MERUN 236 EKAWEVARLSORFPKAEFAEVSKLVTDLTQVHTCECHGDLLECADDRADIAKYICENODSISSKIKECCEKPILEKSECIPEVENDEMPADLPSIADDFVESKDVCKNYPEAKDVFLGMF

ALBU PIG 234 EKAWEVARLSORFPKAEFAEVSKLVTDLTQVHTCECHGDLLECADDRADIAKYICENODSISSKIKECCEKPILEKSECIPEVENDEMPADLPSIADDFVESKDVCKNYPEAKDVFLGMF

ALBU SHEEP 234 EKAWEVARLSORFPKAEFAEVSKLVTDLTQVHTCECHGDLLECADDRADIAKYICENODSISSKIKECCEKPILEKSECIPEVENDEMPADLPSIADDFVESKDVCKNYPEAKDVFLGMF

ALBU BOVIN 234 EKAWEVARLSORFPKAEFAEVSKLVTDLTQVHTCECHGDLLECADDRADIAKYICENODSISSKIKECCEKPILEKSECIPEVENDEMPADLPSIADDFVESKDVCKNYPEAKDVFLGMF

ALBU HORSE 234 EKAWEVARLSORFPKAEFAEVSKLVTDLTQVHTCECHGDLLECADDRADIAKYICENODSISSKIKECCEKPILEKSECIPEVENDEMPADLPSIADDFVESKDVCKNYPEAKDVFLGMF

ALBU CHICK 239 EKAWEVARLSORFPKAEFAEVSKLVTDLTQVHTCECHGDLLECADDRADIAKYICENODSISSKIKECCEKPILEKSECIPEVENDEMPADLPSIADDFVESKDVCKNYPEAKDVFLGMF

ALBUA XENLA 235 EKAWEVARLSORFPKAEFAEVSKLVTDLTQVHTCECHGDLLECADDRADIAKYICENODSISSKIKECCEKPILEKSECIPEVENDEMPADLPSIADDFVESKDVCKNYPEAKDVFLGMF

ALBUB\_XENLA 234 EKAWEVARLSORFPKAEFAEVSKLVTDLTQVHTCECHGDLLECADDRADIAKYICENODSISSKIKECCEKPILEKSECIPEVENDEMPADLPSIADDFVESKDVCKNYPEAKDVFLGMF

\* \* \* \* \*

hhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhh

ALBU HUMAN 355 LYEYERRHPDYSVILLRLAKTYETILEKCCAAADPEHCYARVDEFEKLVDEEONLIKONCELFELGEYGFONALLVRYTKKPOVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKKPEAKRMPCE

ALBU PONPY 355 LYEYERRHPDYSVILLRLAKTYETILEKCCAAADPEHCYARVDEFEKLVDEEONLIKONCELFELGEYGFONALLVRYTKKPOVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKKPEAKRMPCE

ALBU MACMU 355 LYEYERRHPDYSVILLRLAKTYETILEKCCAAADPEHCYARVDEFEKLVDEEONLIKONCELFELGEYGFONALLVRYTKKPOVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKKPEAKRMPCE

ALBU FELCA 355 LYEYERRHPDYSVILLRLAKTYETILEKCCAAADPEHCYARVDEFEKLVDEEONLIKONCELFELGEYGFONALLVRYTKKPOVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKKPEAKRMPCE

ALBU CANFA 355 LYEYERRHPDYSVILLRLAKTYETILEKCCAAADPEHCYARVDEFEKLVDEEONLIKONCELFELGEYGFONALLVRYTKKPOVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKKPEAKRMPCE

ALBU MOUSE 355 LYEYERRHPDYSVILLRLAKTYETILEKCCAAADPEHCYARVDEFEKLVDEEONLIKONCELFELGEYGFONALLVRYTKKPOVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKKPEAKRMPCE

ALBU RAT 355 LYEYERRHPDYSVILLRLAKTYETILEKCCAAADPEHCYARVDEFEKLVDEEONLIKONCELFELGEYGFONALLVRYTKKPOVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKKPEAKRMPCE

ALBU MERUN 356 LYEYERRHPDYSVILLRLAKTYETILEKCCAAADPEHCYARVDEFEKLVDEEONLIKONCELFELGEYGFONALLVRYTKKPOVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKKPEAKRMPCE

ALBU PIG 354 LYEYERRHPDYSVILLRLAKTYETILEKCCAAADPEHCYARVDEFEKLVDEEONLIKONCELFELGEYGFONALLVRYTKKPOVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKKPEAKRMPCE

ALBU SHEEP 354 LYEYERRHPDYSVILLRLAKTYETILEKCCAAADPEHCYARVDEFEKLVDEEONLIKONCELFELGEYGFONALLVRYTKKPOVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKKPEAKRMPCE

ALBU BOVIN 354 LYEYERRHPDYSVILLRLAKTYETILEKCCAAADPEHCYARVDEFEKLVDEEONLIKONCELFELGEYGFONALLVRYTKKPOVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKKPEAKRMPCE

ALBU HORSE 354 LYEYERRHPDYSVILLRLAKTYETILEKCCAAADPEHCYARVDEFEKLVDEEONLIKONCELFELGEYGFONALLVRYTKKPOVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKKPEAKRMPCE

ALBU CHICK 359 LYEYERRHPDYSVILLRLAKTYETILEKCCAAADPEHCYARVDEFEKLVDEEONLIKONCELFELGEYGFONALLVRYTKKPOVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKKPEAKRMPCE

ALBUA XENLA 353 SPWQSOETPEISEQFLLQSAKEYESIUNKCOFSDNPEHCYKDGADREMNEAKERFAYLKONCDILHEHGEYGFENELLIRYTKKPOVSDETLLIGIAHQMAIIGECFAVPPNCRMPCE

ALBUB\_XENLA 354 SPWQSOETPEISEQFLLQSAKEYESIUNKCOFSDNPEHCYKDGADREMNEAKERFAYLKONCDILHEHGEYGFENELLIRYTKKPOVSDETLLIGIAHQMAIIGECFAVPPNCRMPCE

	* * *	* * *	* * *	* * *
	595	hhhhhhhhhhhhh		
ALBU HUMAN	595	EKGKIVAAASCPALGL		
ALBU PONPY	595	EKGKIVAAASCPALGL		
ALBU MACMU	595	EGGKFVAAASCPALA.		
ALBU FELCA	595	EGGKIVAAAQCPALA.		
ALBU CANFA	595	EGEKIVAAAAQPAIV.		
ALBU MOUSE	595	EGENLVTRCKDALA.		
ALBU RAT	595	EGENIVARSKEPALA.		
ALBU MERUN	596	EGGKIVAAESCPALA.		
ALBU PTG	594	EGGKFVIIIRGULA.		
ALBU SHEEP	594	EGGKVASTQCPALA.		
ALBU BOVIN	594	EGGKLWSTCTOTALA.		
ALBU HORSE	594	EGGKIVASSQDALA.		
ALBU CHICK	599	EGANLVHQSRAITLGI		
ALBUA XENLA	593	EREWLIEHCCKLHP.		
ALBUS XENLA	594	EREWLIEHCCKLHP.		

### 7.3 Für Klonierungen und Mutagenesen verwendete Oligonukleotide

Nr.	Beschreibung aller Klonierung	Sequenz 5'→3'	Strang	Verw. zweck
3182	forw FCRN-receptor (Human)	GTCGGGAGGAGTCACGTGCCC	+	PCR
3183	rev FCRN-receptor (Human)	GAAAGGGGCCTGACTACATTCCG	-	PCR
3184	forw FCRN-receptor (Human)	CCTCTCAGCATGGGGGTC	+	PCR
3185	rev FCRN-receptor (Human)	GGTCAGGCGGTGGCTGG	-	PCR
3315	beta-2Microglobulin 1 forw_human	GAGGCGTCGCGCTGGCGGG	+	PCR
3316	beta-2Microglobulin 1 rev_human	GGAATTCATCCAATCCAAATGCGG	-	PCR
3317	beta-2Microglobulin 2 forw_human	GCCGAGATGTCTCGCTCC	+	PCR
3318	beta-2Microglobulin 2 rev_human	GCTGCTTACATGTCTCGATC	-	PCR
3673	rHA KATKE -> QATKE	CGTGAAACACAAGCCCCcAGGCAACAAAAGAGCAACTG	+	Mutagenese
3674	rHA KATKE -> QATKE	CAGTTGCTCTTTTGTTCCTgGGGCTTGTGTTTCACG	-	Mutagenese
3675	rHA KATKE -> HATKE	CGTGAAACACAAGCCCCcAcGCAACAAAAGAGCAACTGAAAGC	+	Mutagenese
3676	rHA KATKE -> HATKE	GCTTTCAGTTGCTCTTTTGTTCGgTgGGGCTTGTGTTTCACG	-	Mutagenese
3677	rHA KATKE -> KATKD	CAAGCCCCAAGGCAACAAAAGAtCAACTGAAAGCTGTTATGG	+	Mutagenese
3678	rHA KATKE -> KATKD	CCATAACAGCTTTCAGTTGaTCTTTTGTTCCTTGGGCTTG	-	Mutagenese



<b>3198</b>	rHA E519A	GCTCTGGAAGTCGATGcAACATACGTTCCCAAAGAG	+	Mutagenese
<b>3199</b>	rHA E519A	CTCTTTGGGAACGTATGTTgCATCGACTTCCAGAGC	-	Mutagenese
<b>3200</b>	rHA E529A	CCCAAAGAGTTTAATGCTGcAACATTACCTTCCATGC	+	Mutagenese
<b>3201</b>	rHA E529A	GCATGGAAGGTGAATGTTgCAGCATTAACTCTTTGGG	-	Mutagenese
<b>3204</b>	rHA K562A	GCTCGTGAAACACAAGCCCgccGCAACAAAAGAGCAACTG	+	Mutagenese
<b>3205</b>	rHA K562A	CAGTTGCTCTTTTGTGcggcGGGCTTGTGTTTCACGAGC	-	Mutagenese
<b>3212</b>	rHA_del_KHPEAK_und KADDKET/ASAAAAS	ctagcGCCGCAGCGg	+	Synth.Sequenz
<b>3213</b>	rHA_del_KHPEAK KADDKET/ASAAAAS und	ctagcCGCTGCGGCg	-	Synth.Sequenz
<b>3214</b>	rHA_del_KTPV_ASAAS	ctagcGCCg	+	Synth.Sequenz
<b>3215</b>	rHA_del_KTPV_ASAAS	ctagcGGCg	-	Synth.Sequenz
<b>3216</b>	rHA_del_ETYVPKEFNAE/ASAAAAAAAAS	ctagcGCCGCAGCGGCCGCGGCAGCCg	+	Synth.Sequenz
<b>3217</b>	rHA_del_ETYVPKEFNAE/ASAAAAAAAAS	ctagcGGCTGCCGCGGCCGCTGCGGCg	-	Synth.Sequenz
<b>3218</b>	rHA_del_KATKE/ASAAAS	ctagcGCTGCCg	+	Synth.Sequenz
<b>3219</b>	rHA_del_KATKE/ASAAAS	ctagcGGCAGCg	-	Synth.Sequenz
<b>3220</b>	rHA_del_KLVAASSQAA/ASAAAAAAS	ctagcGCGGCCGCAGCGGCTGCAg	+	Synth.Sequenz
<b>3221</b>	rHA_del_KLVAASSQAA/ASAAAAAAS	ctagcTGCAGCCGCTGCGGCCGCGg	-	Synth.Sequenz
<b>3222</b>	rHA_del_KHPEAK	GTGGGCAGCAAATGTTGTgctagcATGCCCTGTGCAG	+	Mutagenese
<b>3223</b>	rHA_del_KHPEAK	CTGCACAGGGCATgctagcACAACATTTGCTGCCCAC	-	Mutagenese
<b>3224</b>	rHA_del_KTPV	GTGTGTTGCATGAGgctagcGACAGAGTCACC	+	Mutagenese

<b>3225</b>	rHA_del_KTPV	GGTGACTCTGTCgctagcCTCATGCAACACAC	-	Mutagenese
<b>3226</b>	rHA_del_ETYVPKEFNAE	CAGCTCTGGAAGTCGATgctagcACATTACCTTCCATGC	+	Mutagenese
<b>3227</b>	rHA_del_ETYVPKEFNAE	GCATGGAAGGTGAATGTgctagcATCGACTTCCAGAGCTG	-	Mutagenese
<b>3228</b>	rHA_del_KATKE	CGTGAAACACAAGCCCgctagcCTGAAAGCTGTTATGG	+	Mutagenese
<b>3229</b>	rHA_del_KATKE	CCATAACAGCTTTCAGgctagcGGGCTTGTGTTTCACG	-	Mutagenese
<b>3230</b>	rHA_del_KADDKET	GAAGTGCTGCgctagcTGCTTTGCCGAGGAGGG	+	Mutagenese
<b>3231</b>	rHA_del_KADDKET	CCCTCCTCGGCAAAGCAgctagcGCAGCACTTC	-	Mutagenese
<b>3232</b>	rHA_del_KLVAASSQAA	GCTTTGCCGAGGAGGGTAAAgctagcTTAGGCTTATAACATCTAC	+	Mutagenese



## 7.4 Klonnummern und deren Mutationen im Albumin

Klon Nr.	ursprüngliche Sequenz	nach Mutation (bei Albumin)	Vektor	zur Transfektion in
529	pIRES ohne Gen		pIRES	HEK
1645	pMARES ohne Gen		pMARES	CHO
1767	Albumin Wildtyp ohne <i>NheI</i>		pIRES	HEK
1774	KHPEAK	AS	pIRES	HEK
1775	KTPV	AS	pIRES	HEK
1776	ETYVPKEFNAE	AS	pIRES	HEK
1777	KATKE	AS	pIRES	HEK
1778	KADDKET	AS	pIRES	HEK
1779	KLVAASSQAA	AS	pIRES	HEK
1796	KHPEAK	AAAAAS	pIRES	HEK
1797	KTPV	AAAS	pIRES	HEK
1798	ETYVPKEFNAE	AAAAAAAAAAS	pIRES	HEK
1799	KATKE	AAAAS	pIRES	HEK
1800	KADDKET	AAAAAAS	pIRES	HEK
1808	FcRn komplettes Gen		pCR4 Topo	Klonierungsvektor
1801	KLVAASSQAA	AAAAAAAAAAS	pIRES	HEK
1815	KADDKET+T515	AAAAAAS+ A515	pIRES	HEK

<b>1833</b>	beta-2 Mikroglobulin komplettes Gen		pCR4 Topo	Klonierungsvektor	
<b>1836</b>	FcRn komplettes Gen		pMARES	CHO	
<b>1837</b>	beta-2 Mikroglobulin komplettes Gen		pMARES	CHO	
<b>1853</b>	E519 + E529	A519 + A529	pMARES	CHO	
<b>1954</b>	KATKE	AAAAS	pMARES	CHO	
<b>2129</b>	KATKE	AATKE	pMARES	CHO	
<b>2166</b>	KATKE	QATKE	pMARES	CHO	
<b>2167</b>	KATKE	HATKE	pMARES	CHO	
<b>2168</b>	KATKE	KATKD	pMARES	CHO	

## 7.5 Genkarten von verwendeten Vektoren

### 7.5.1 Das Expressionsplasmid pIRES puro 3 (BD Biosciences)

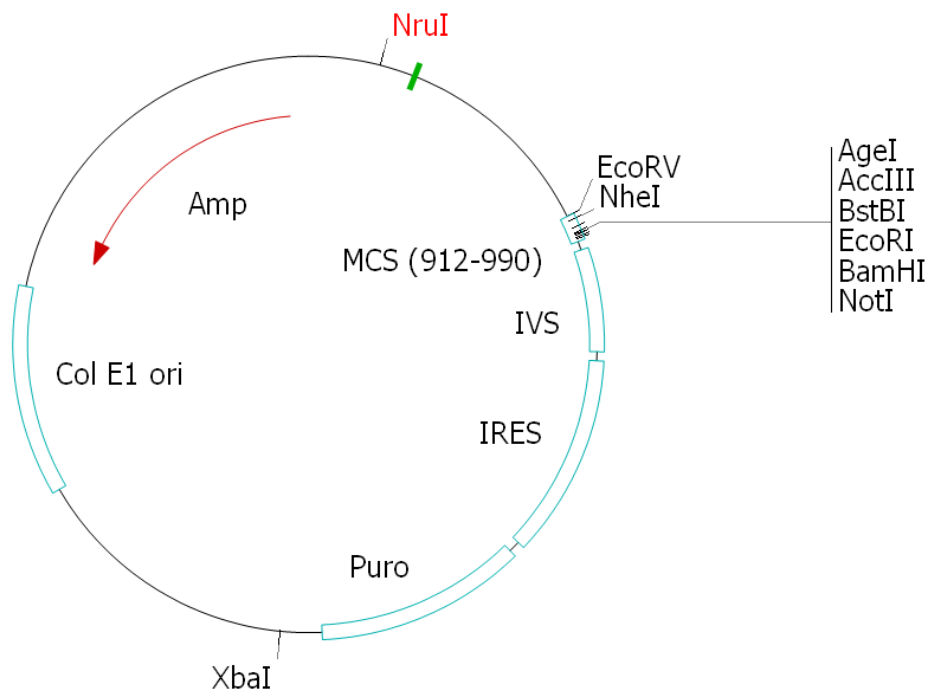


Abb. 7.1.: Plasmidkarte des für die Expression von Albumin in HEK-Zellen verwendeten Vektors pIRES puro 3

### 7.5.2 Das Expressionssystem pMARES neo

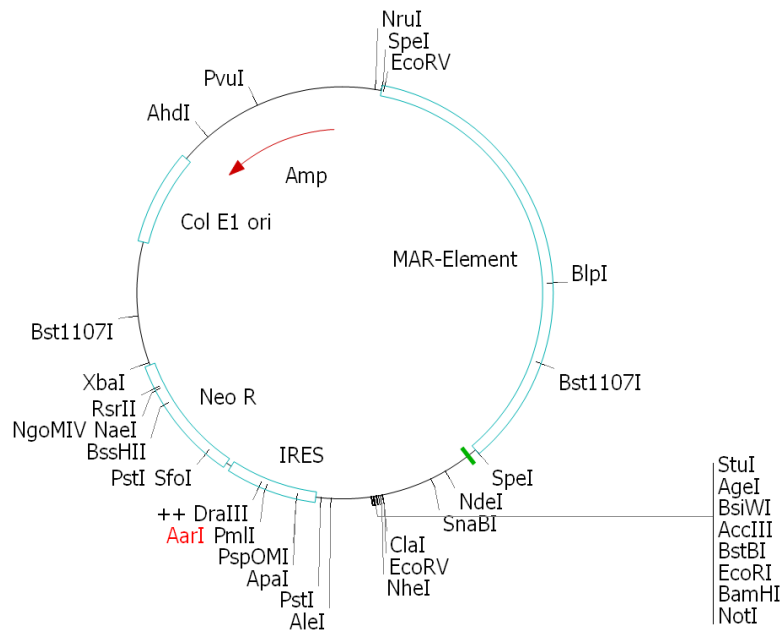


Abb. 7.2.: Plasmidkarte des für die Expression von Albumin und FcRn in CHO-Zellen verwendeten Vektors pMARES neo

### 7.5.3 Der Klonierungsvektor pCR4 Topo (Invitrogen)

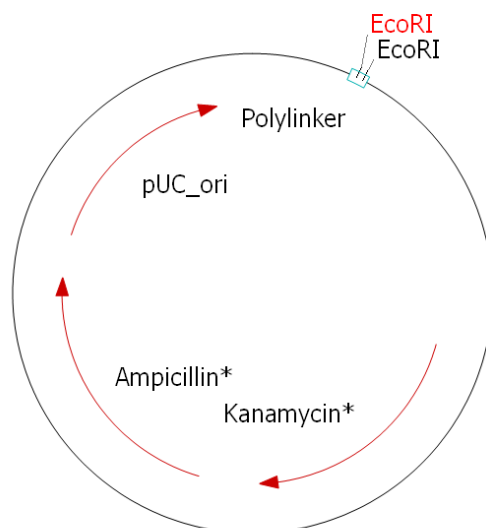
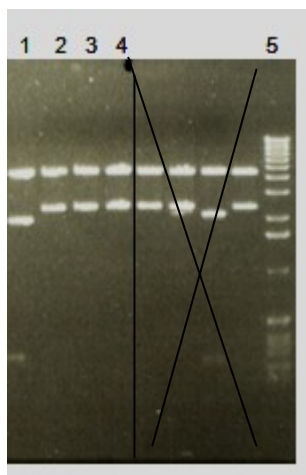


Abb. 7.3.: Plasmidkarte des für die Mutagenesen verwendeten Vektors pCR4 Topo

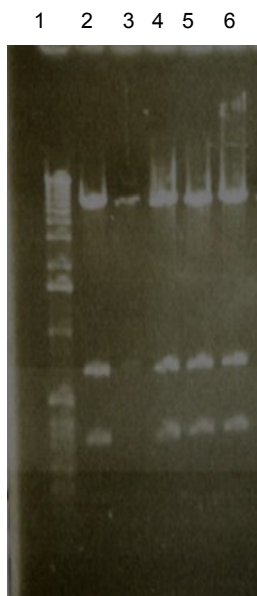
## 7.6 Gelbilder

### 7.6.1.1 Agarosegelbilder zu Kapitel 3.1.1.2



Spur 1	1775
Spur 2	NheI nicht verdaut, aber XbaI
Spur 3	NheI nicht verdaut, aber XbaI
Spur 4	NheI nicht verdaut, aber XbaI
Spur 5	Marker 1 kb

Abb. 7.4: Plasmid 1775 geschnitten mit XbaI und NheI

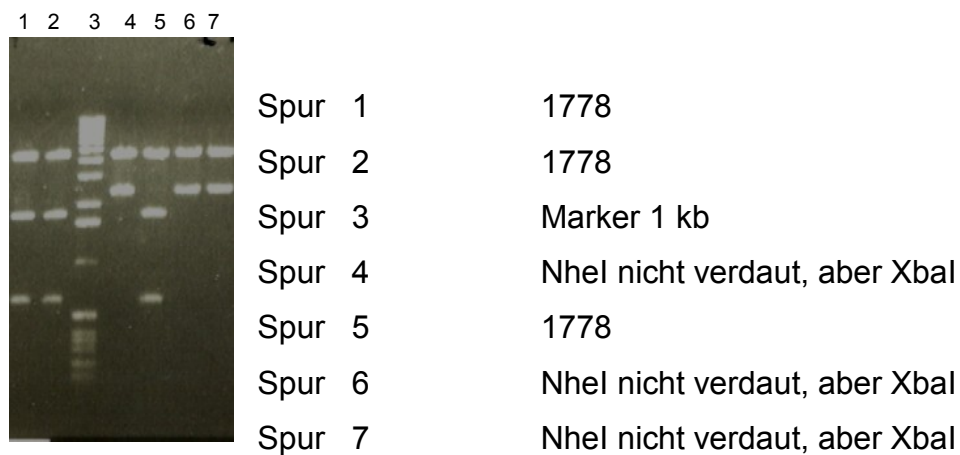


Spur 1	Marker 1 kb
Spur 2	1776
Spur 3	weder XbaI noch NheI hat verdaut
Spur 4	1776
Spur 5	1776
Spur 6	1776

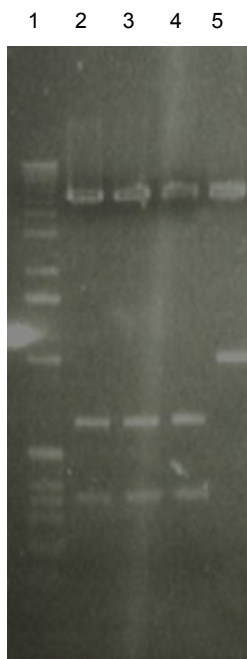
Abb. 7.5: Plasmid 1776 geschnitten mit XbaI und NheI



**Abb. 7.6: Plasmid 1777 geschnitten mit XbaI und NheI**



**Abb. 7.7: Plasmid 1778 geschnitten mit XbaI und NheI**



Spur 1	Marker 1 kb
Spur 2	1779
Spur 3	1779
Spur 4	1779
Spur 5	NheI nicht verdaut, aber XbaI

## **7.7 Graphen und Tabellen zur Fermentation**

### **7.7.1 Bilanzierung der exemplarisch dargestellten Fermentation des Klons 1954**



Tab.: 7.1: Übersicht über die während der Fermentation bestimmten Parameter

Probe Nr.:	Datum	Uhrzeit	Dauer	Zellzählung				Glutamin	Glutamat	Glucose	Lactat	Ammonium
			der	lebend	tot	gesamt	Vitalität					
			Fermentation					Gln	Glu	Gluc.	Lac.	NH4+
			[d]	[x1E5/ml]	[x1E5/ml]	[x1E5/ml]	[%]	[mmol/L]	[mmol/L]	[g/l]	[g/l]	[mmol/L]
BR313-1	07.12.2008	11:57	0,0	2,28	0,77	3,05	75	5,68	0,87	5,00	1,23	1,77
BR313-2	08.12.2008	6:46	0,8	2,37	0,79	3,16	75	5,14	1,05	4,55	1,65	2,42
BR313-3	09.12.2008	6:47	1,8	3,64	0,80	4,44	82	3,43	2,32	3,89	2,13	3,37
BR313-4	10.12.2008	6:25	2,8	3,53	0,78	4,31	82			1	0,00	2,81
BR313-5	11.12.2008	10:32	3,9	6,93	1,06	7,99	87	5,81	1,41	4,45	2,43	4,42
BR313-6	13.12.2008	6:20	5,8	20,31	1,15	21,46	95	3,37	2,01	1,10	3,60	5,76
BR313-7	13.12.2008	10:47	6,0	6,03	0,43	6,46	93	5,55	0,78	6,01	1,22	2,79
BR313-8	14.12.2008	6:50	6,8	6,93	0,39	7,32	95	4,87	0,94	5,66	1,70	3,59
BR313-9	15.12.2008	6:37	7,8	14,68	1,00	15,68	94	3,19	1,36	4,28	2,72	4,93
BR313-10	16.12.2008	6:10	8,8	24,79	1,28	26,07	95	2,86	1,86	2,08	3,66	6,08
BR313-11	17.12.2008	10:13	9,9	5,84	0,44	6,28	93	0,00	0,80	6,66	1,19	3,41
BR313-12	20.12.2008	6:17	12,8	30,23	1,14	31,37	96	0,69	1,74	1,30	4,01	5,29

### 7.7.1.1 Verlauf des pH Wertes während der Fermentation des Albuminklons 1954

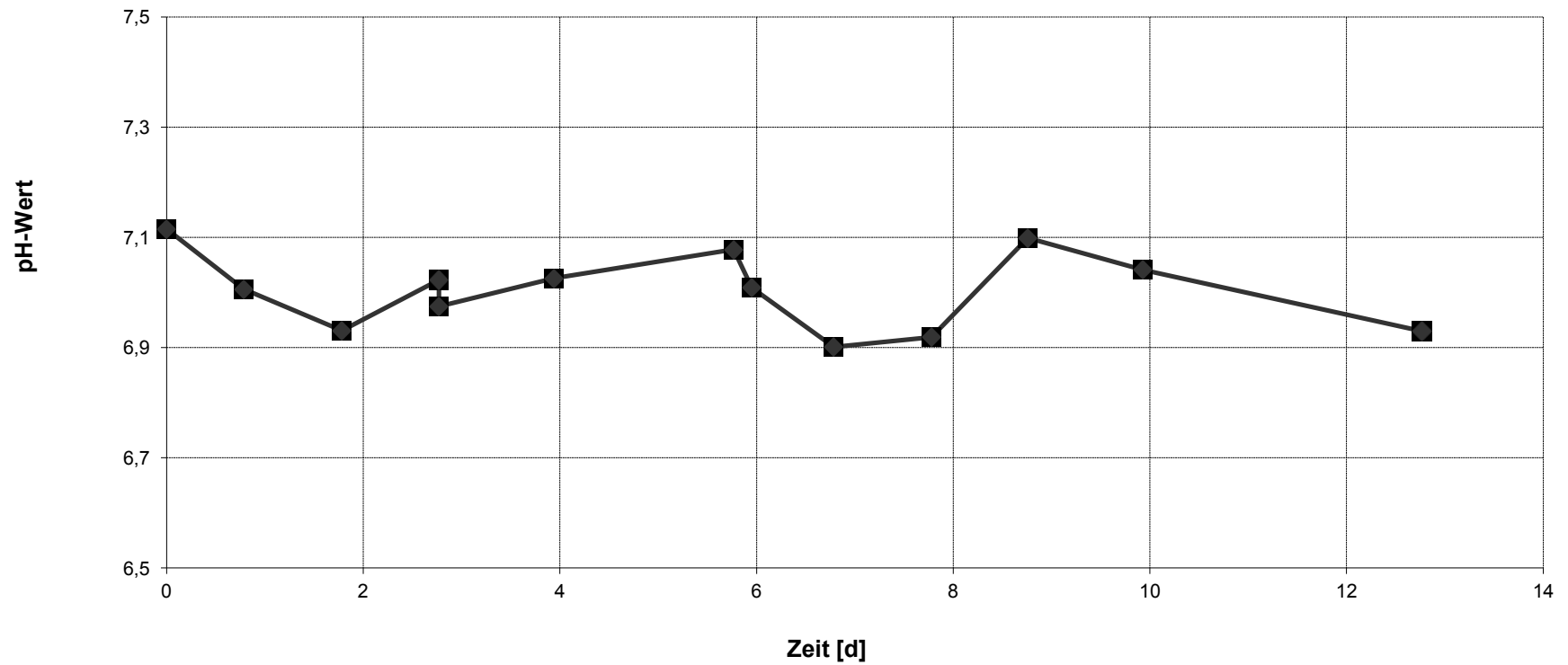


Abb. 7.8: Verlauf des pH Wertes während der Fermentation von Albuminklon 1954, der pH Wert wird durch die Eintragung von  $\text{CO}_2$  oder 0,5 M Natronlauge in einem Bereich zwischen pH 6,9 und pH 7,1 konstant gehalten

### 7.7.1.2 Wachstumsraten

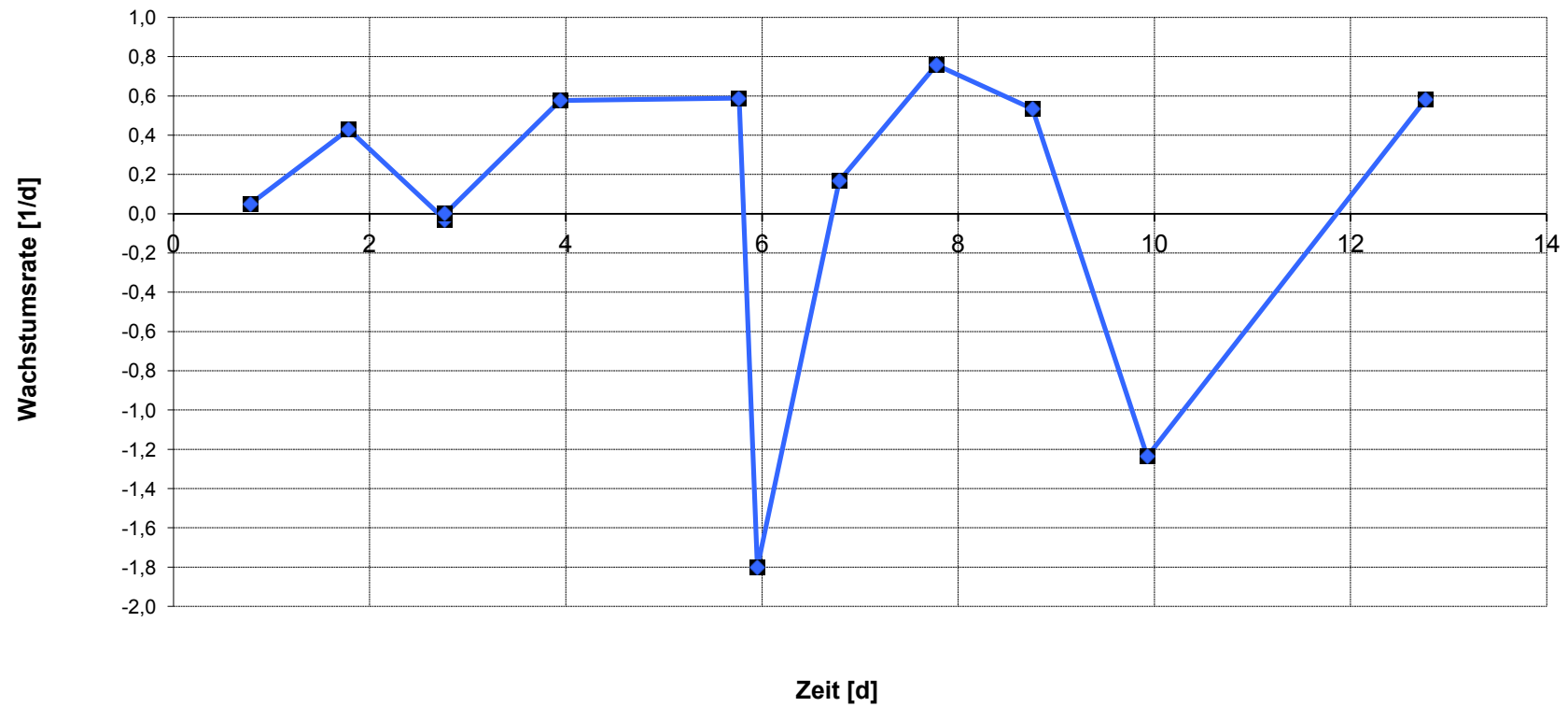


Abb. 7.9: Wachstumsraten während der Fermentation von Albuminklon 1954, die Erntezeitpunkte der ersten beiden *batches* an Tag sechs und zehn sind an der negativen Wachstumsrate zu erkennen.

### 7.7.1.3 Glukoseverbrauch und Laktatbildung

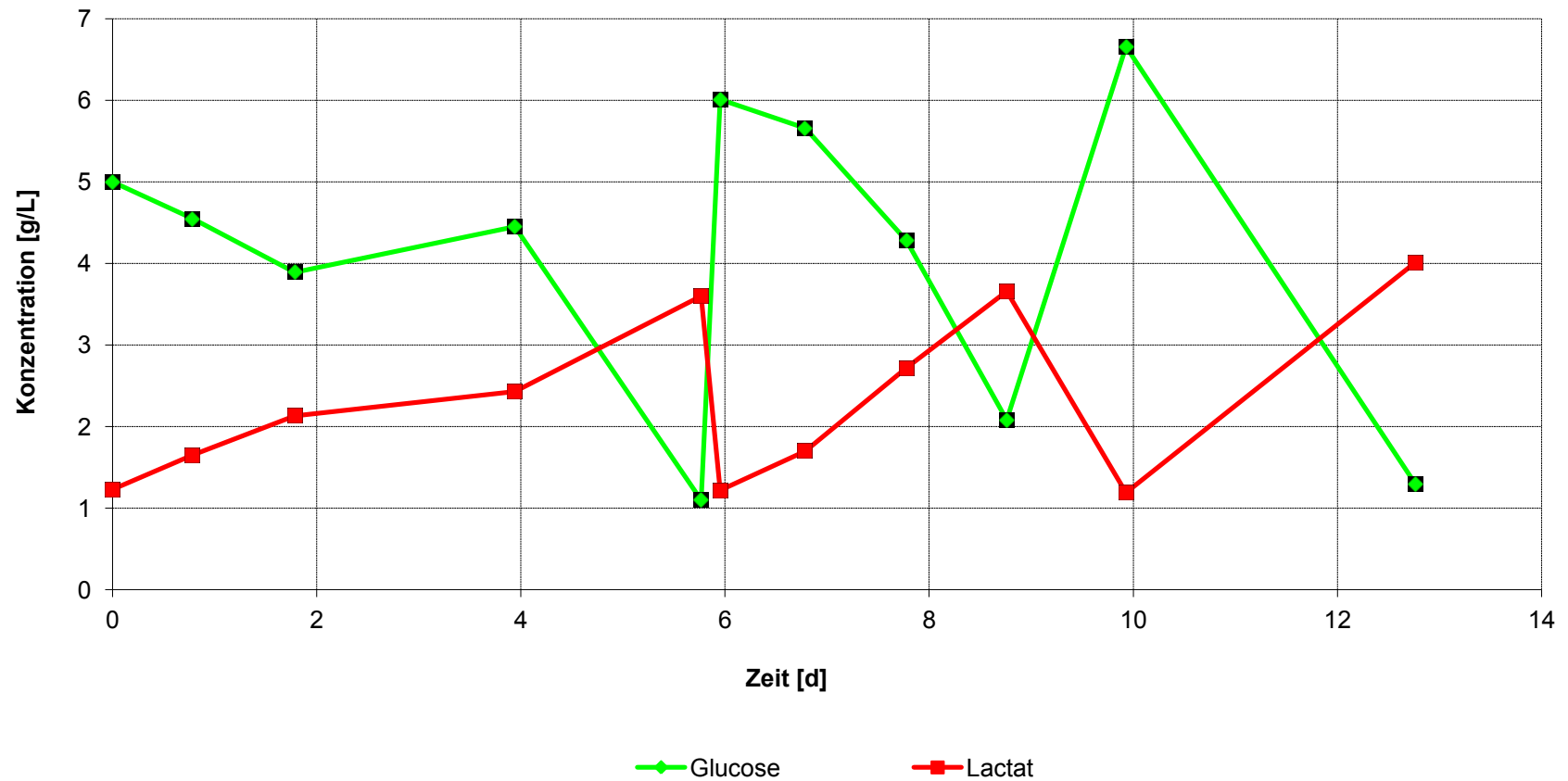


Abb. 7.10: Der Verbrauch von Glucose und die Bildung von Laktat während der Fermentation von Albuminklon 1954, die Erntezeitpunkte an den Tagen sechs, zehn und dreizehn sind an den Minima der Glukosekonzentration und den Maxima der Laktatkonzentration zu erkennen.

#### 7.7.1.4 Glutaminverbrauch, Glutamat- und Ammoniumbildung

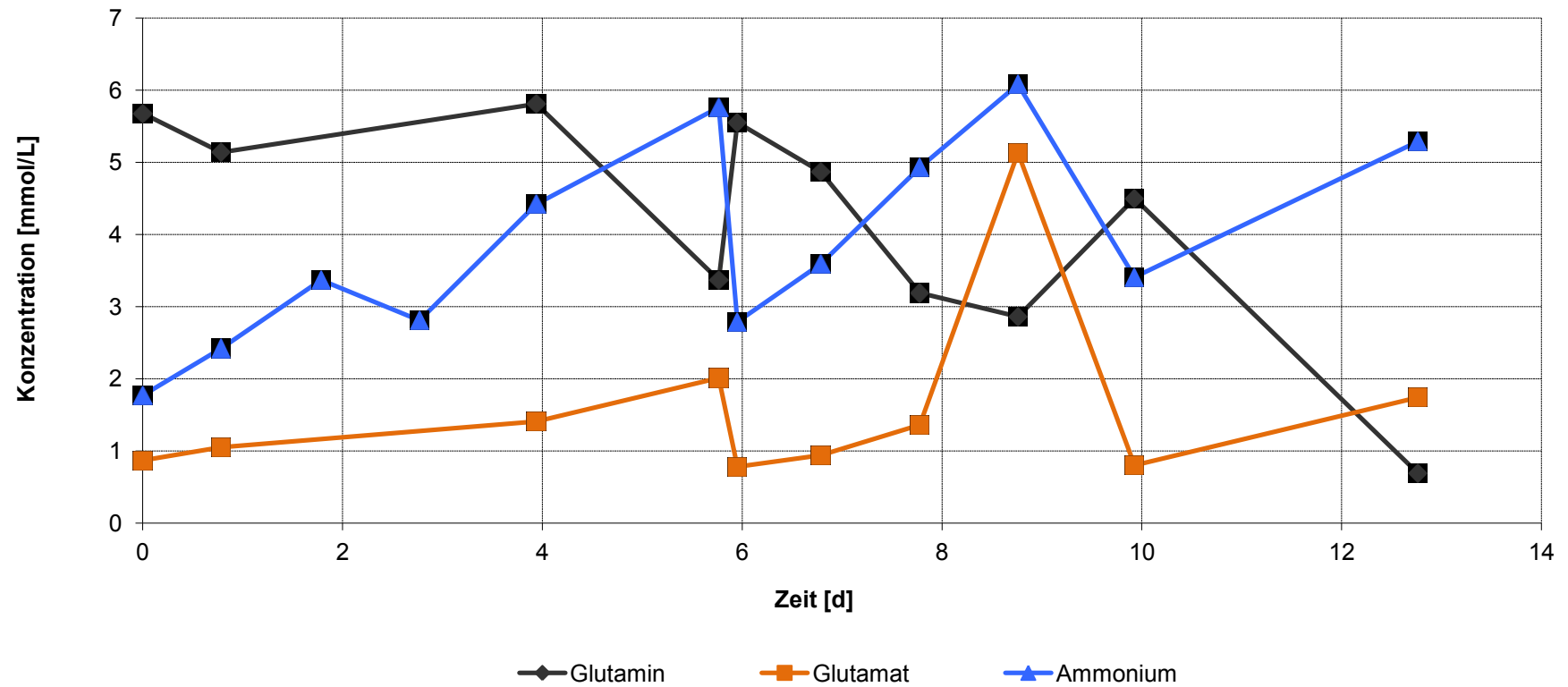


Abb. 7.11: Der Verbrauch von Glutamin, sowie die Bildung von Glutamat und Ammonium während der Fermentation von Albuminklon 1954, die Erntezeitpunkte an den Tagen sechs, zehn und dreizehn sind an den Minima der Glutamat- und den Ammoniumkonzentration, sowie an dem Maxima der Glutaminkonzentration zu erkennen

## 7.8 Graphen zu Abbaukinetiken in der Ratte

### 7.8.1 Graphen zu alaninisierten Albuminen

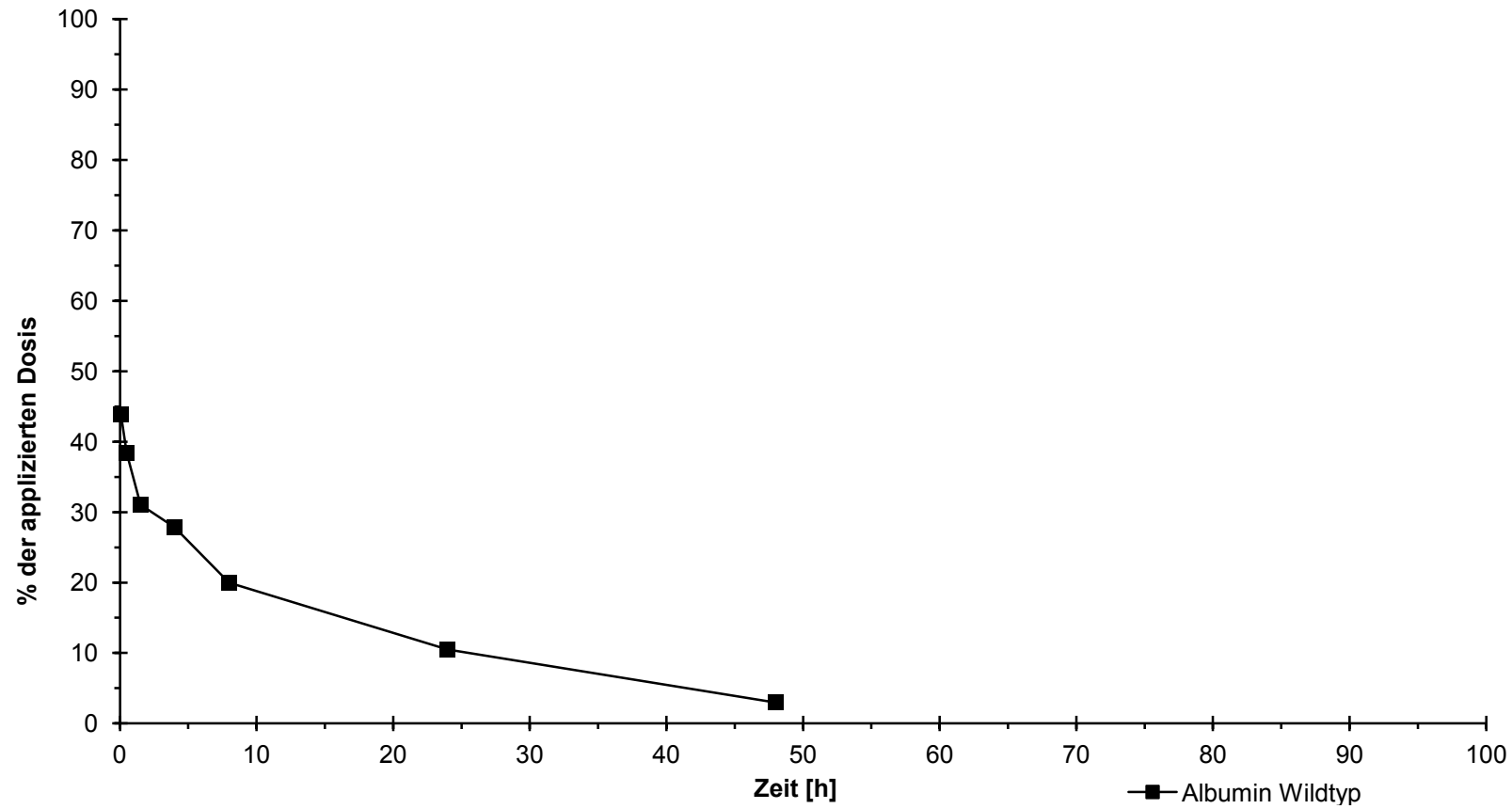


Abb. 7.12: Abbau von Wildtyp Albumin in der Ratte

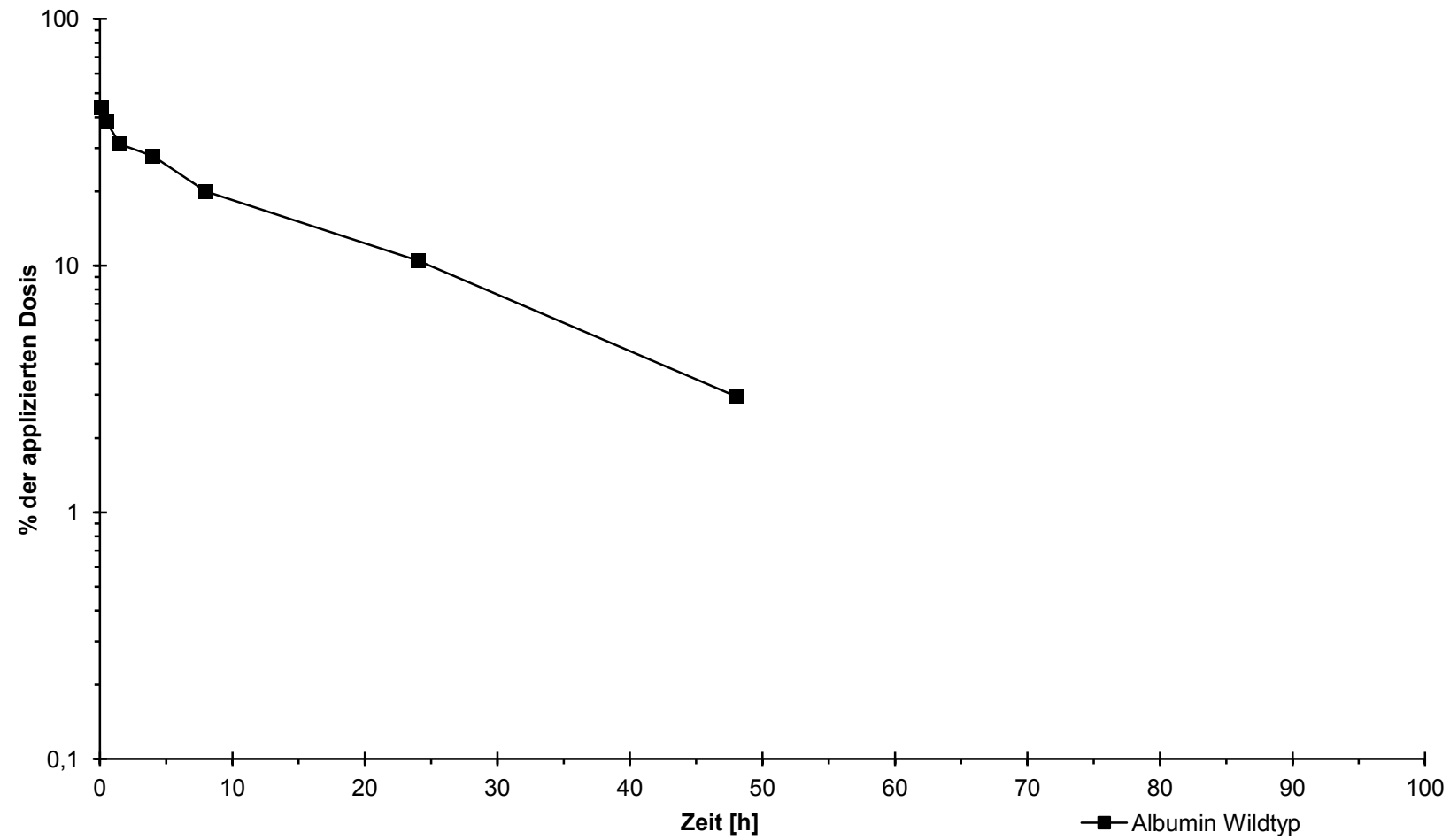


Abb. 7.13: Abbau von Wildtyp Albumin in der Ratte in halblogarithmischer Auftragung

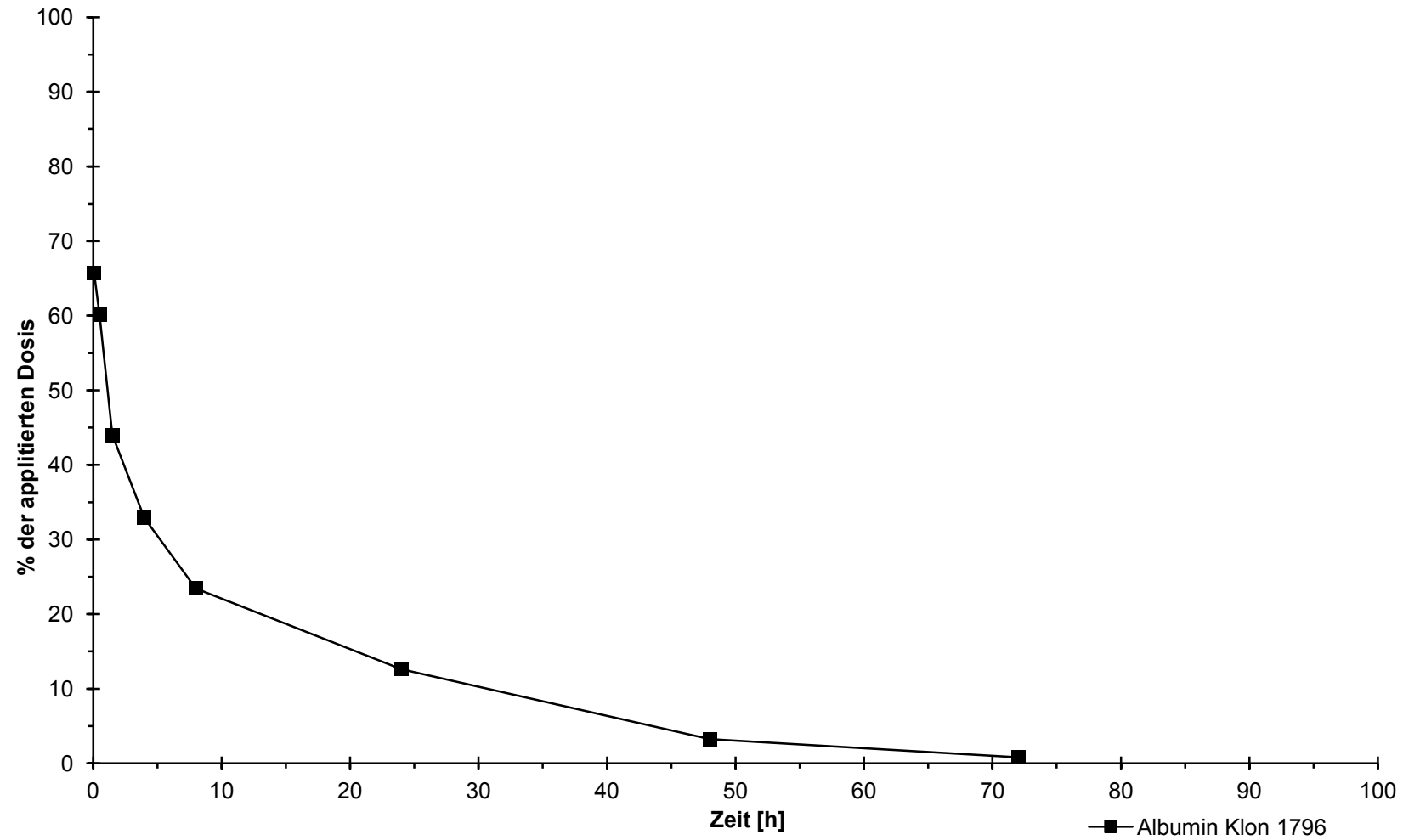


Abb. 7.14: Abbau des Albuminklons 1796 in der Ratte



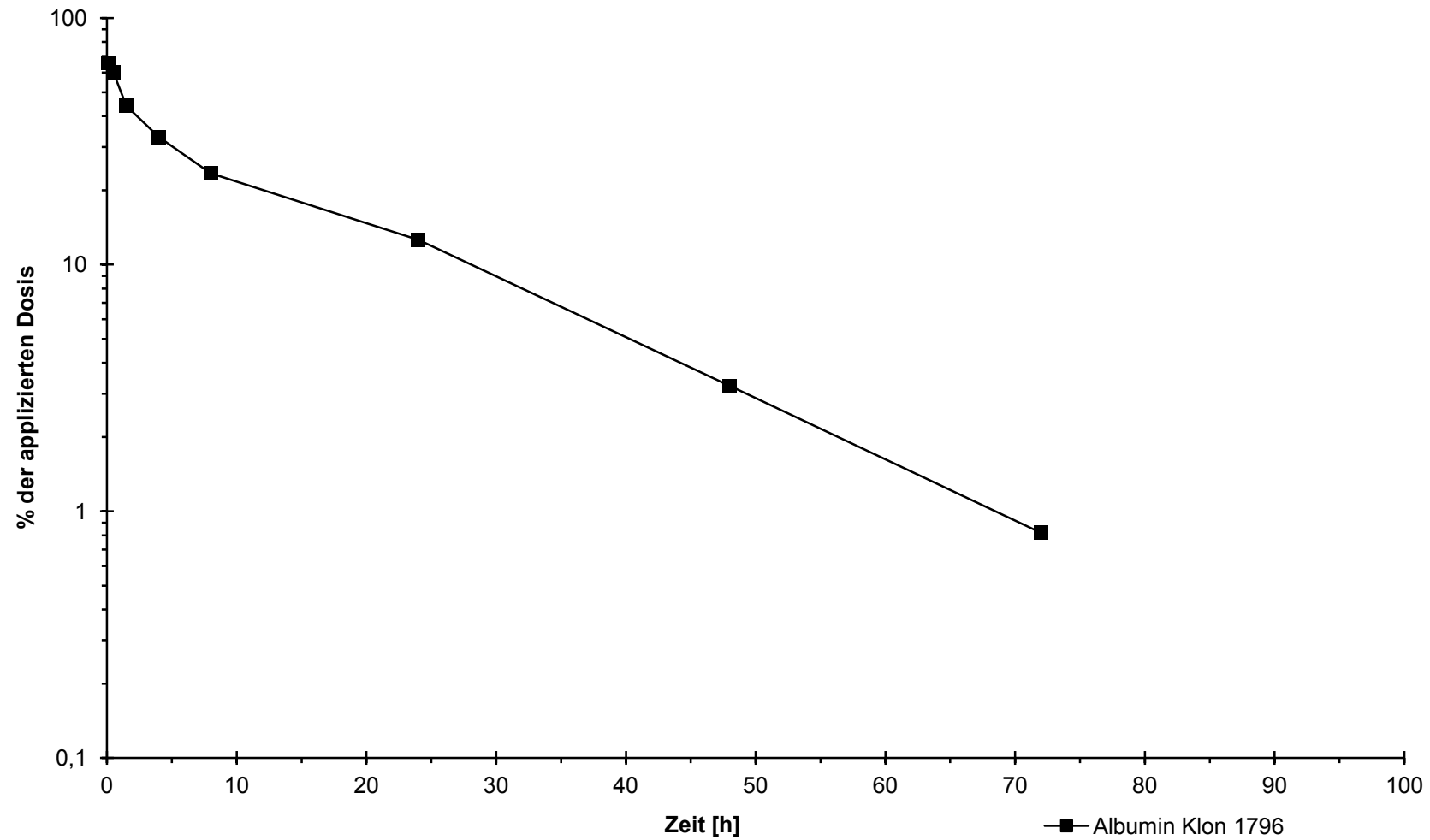


Abb. 7.15: Abbau des Albuminklons 1796 in der Ratte in halblogarithmischer Auftragung

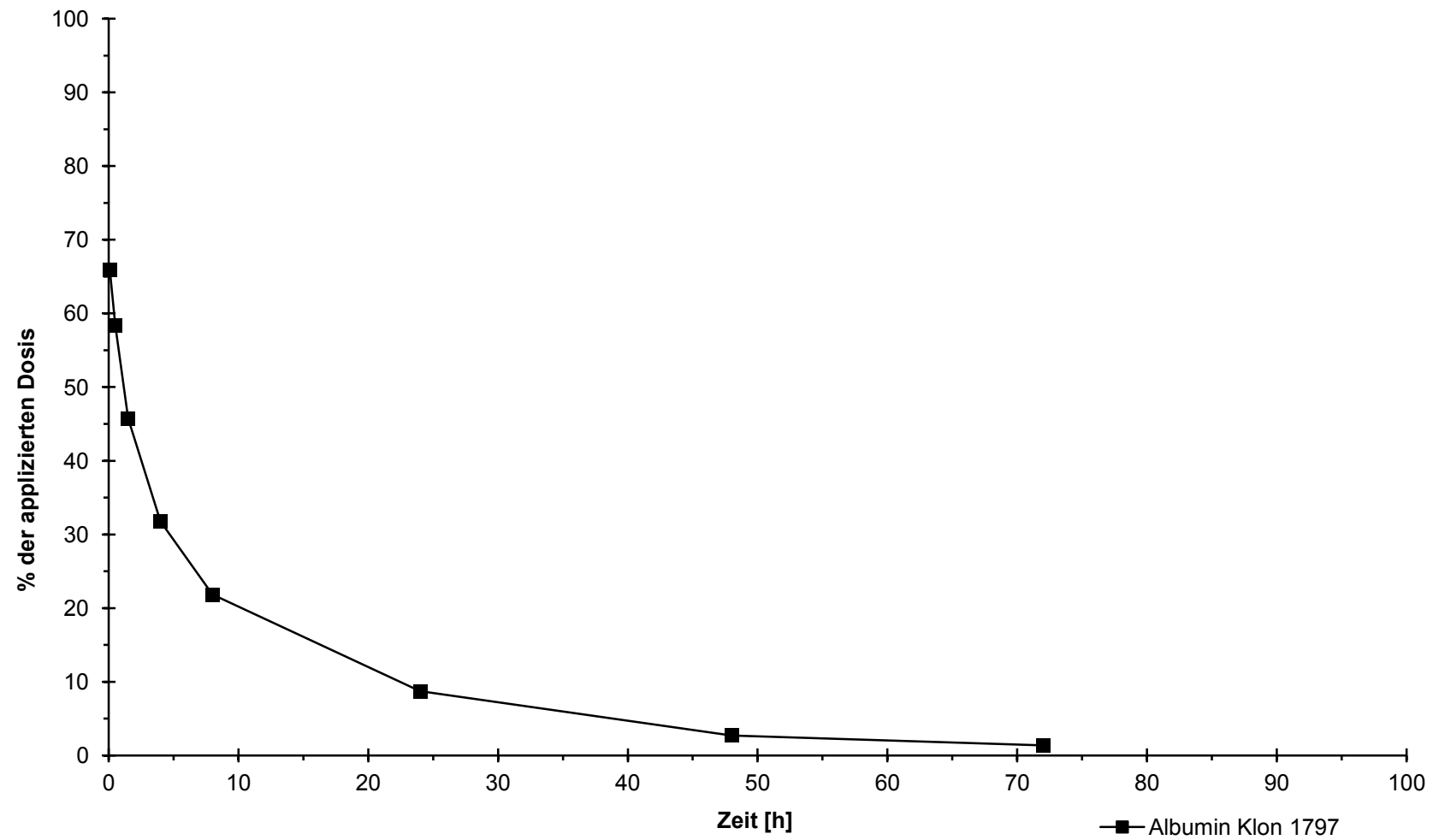


Abb. 7.16: Abbau des Albuminklons 1797 in der Ratte

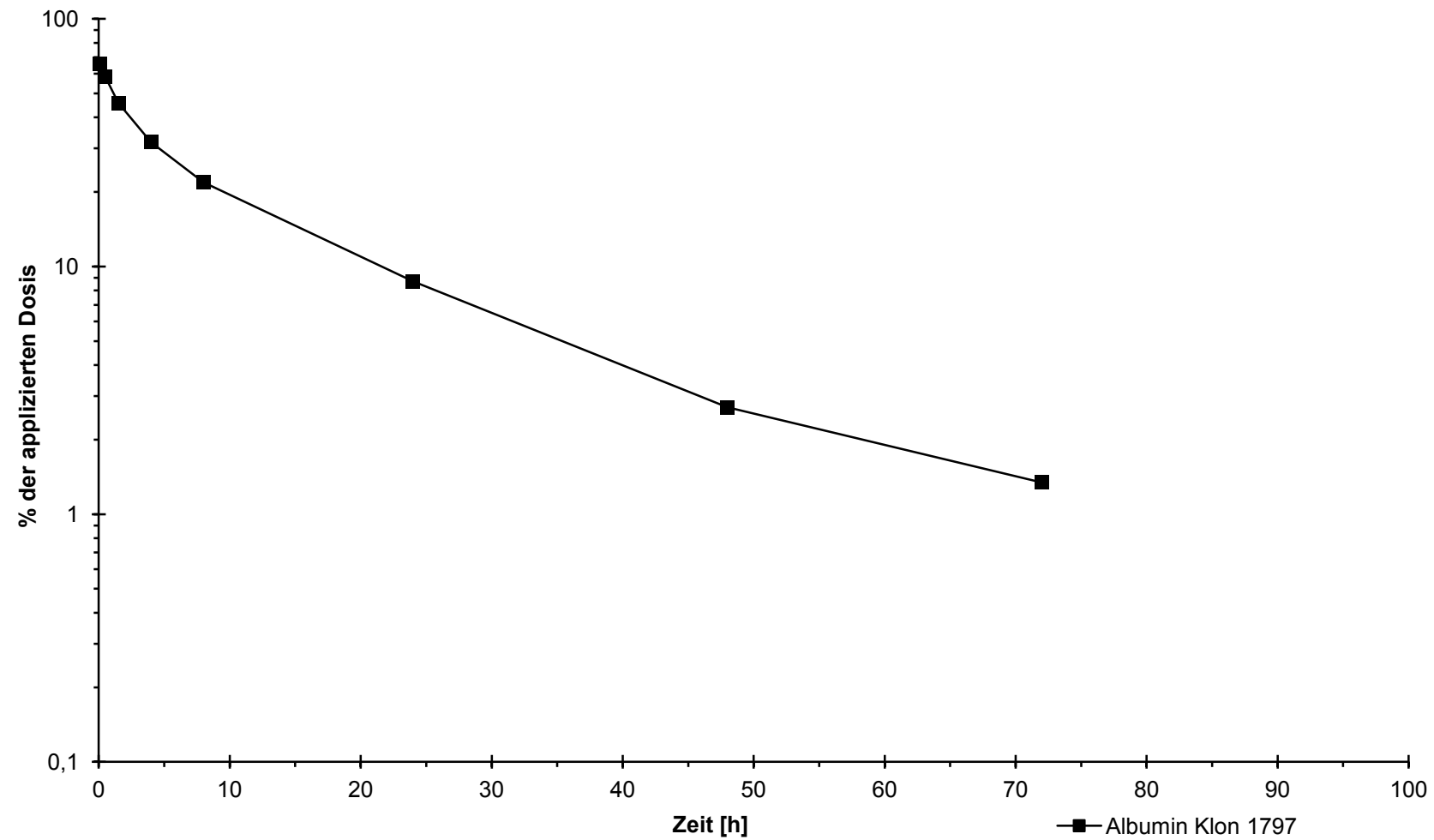


Abb. 7.17: Abbau des Albuminklons 1797 in der Ratte in halblogarithmischer Auftragung

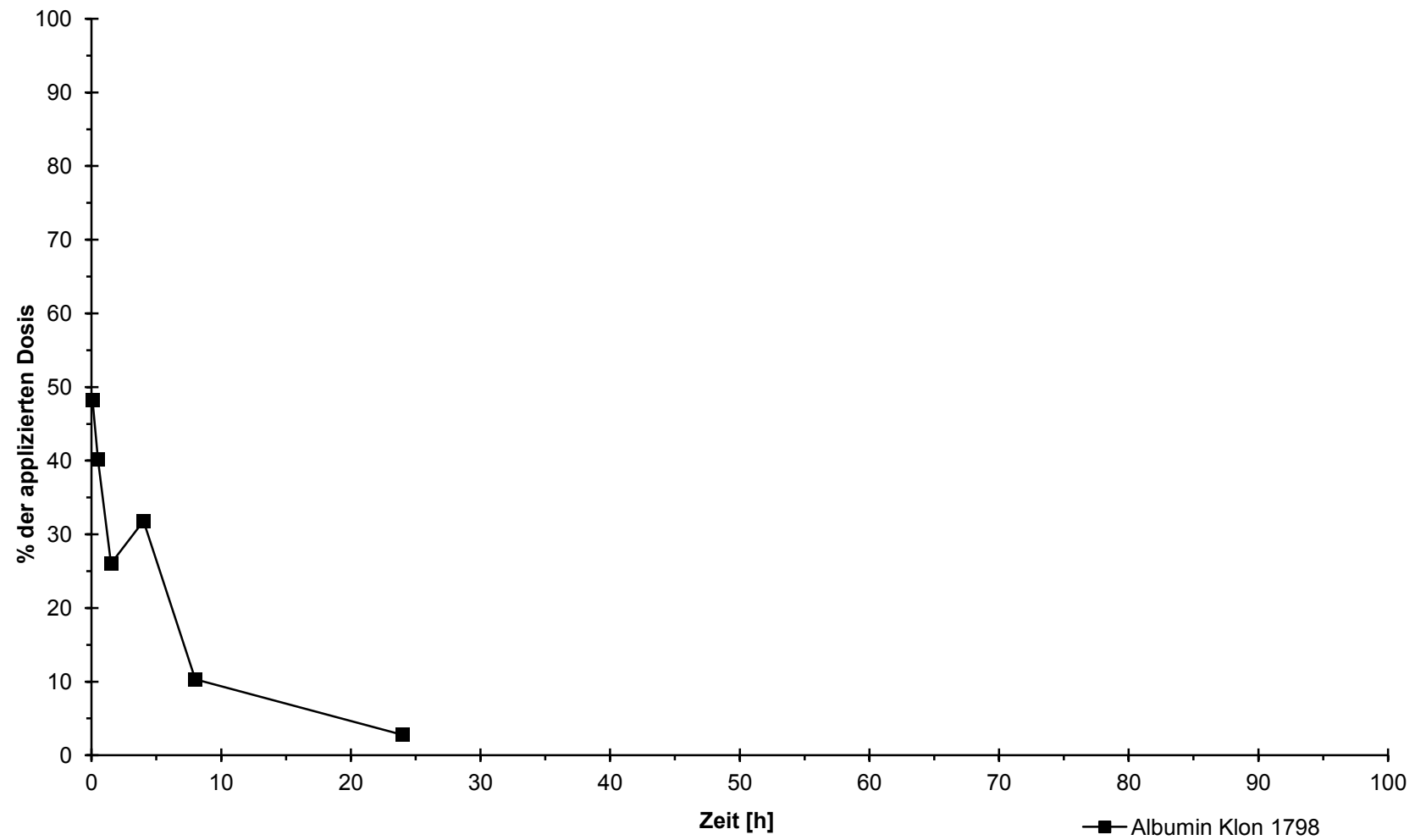


Abb. 7.18: Abbau des Albuminklons 1798 in der Ratte

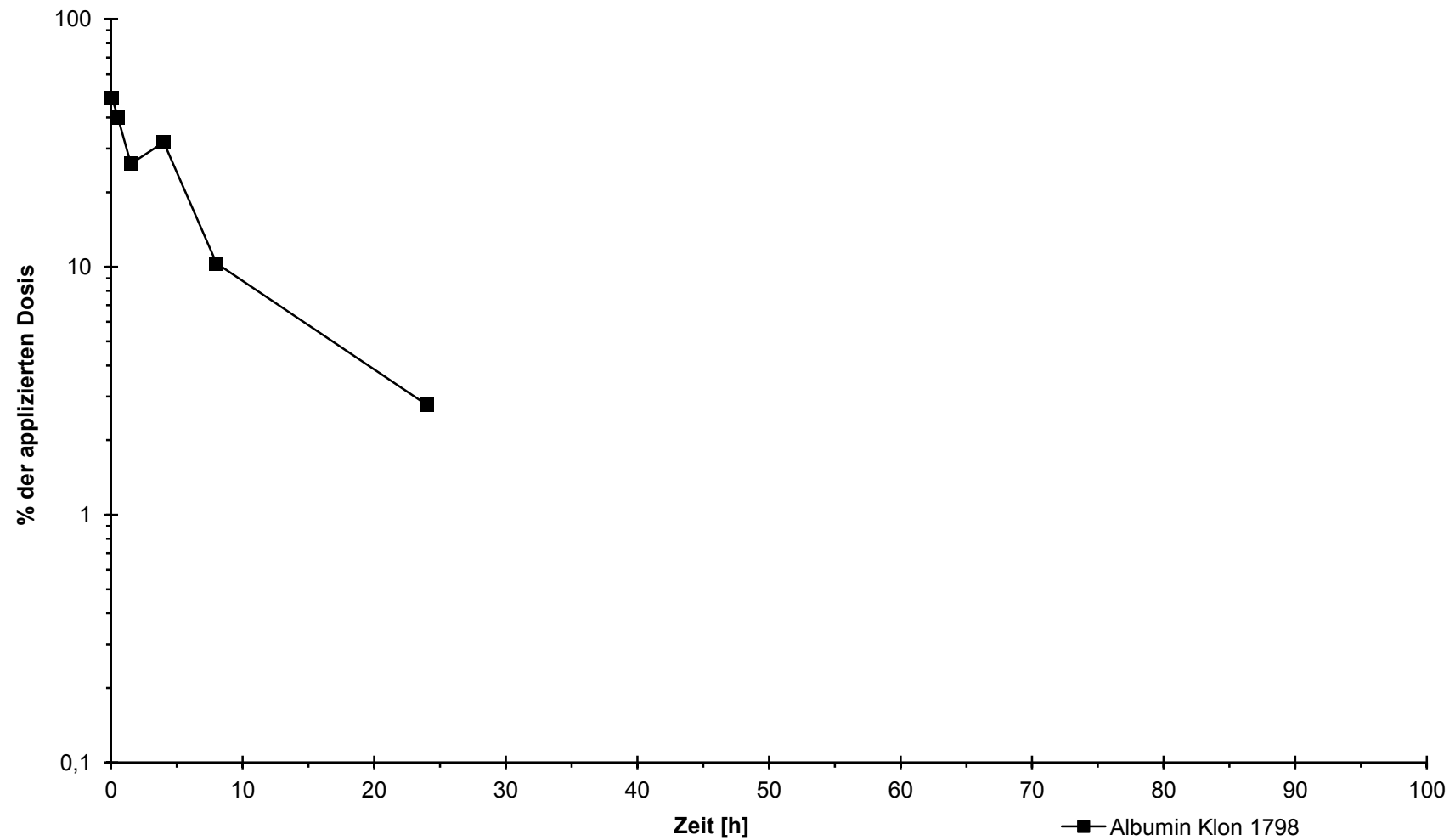


Abb. 7.19: Abbau des Albuminklons 1798 in der Ratte in halblogarithmischer Auftragung

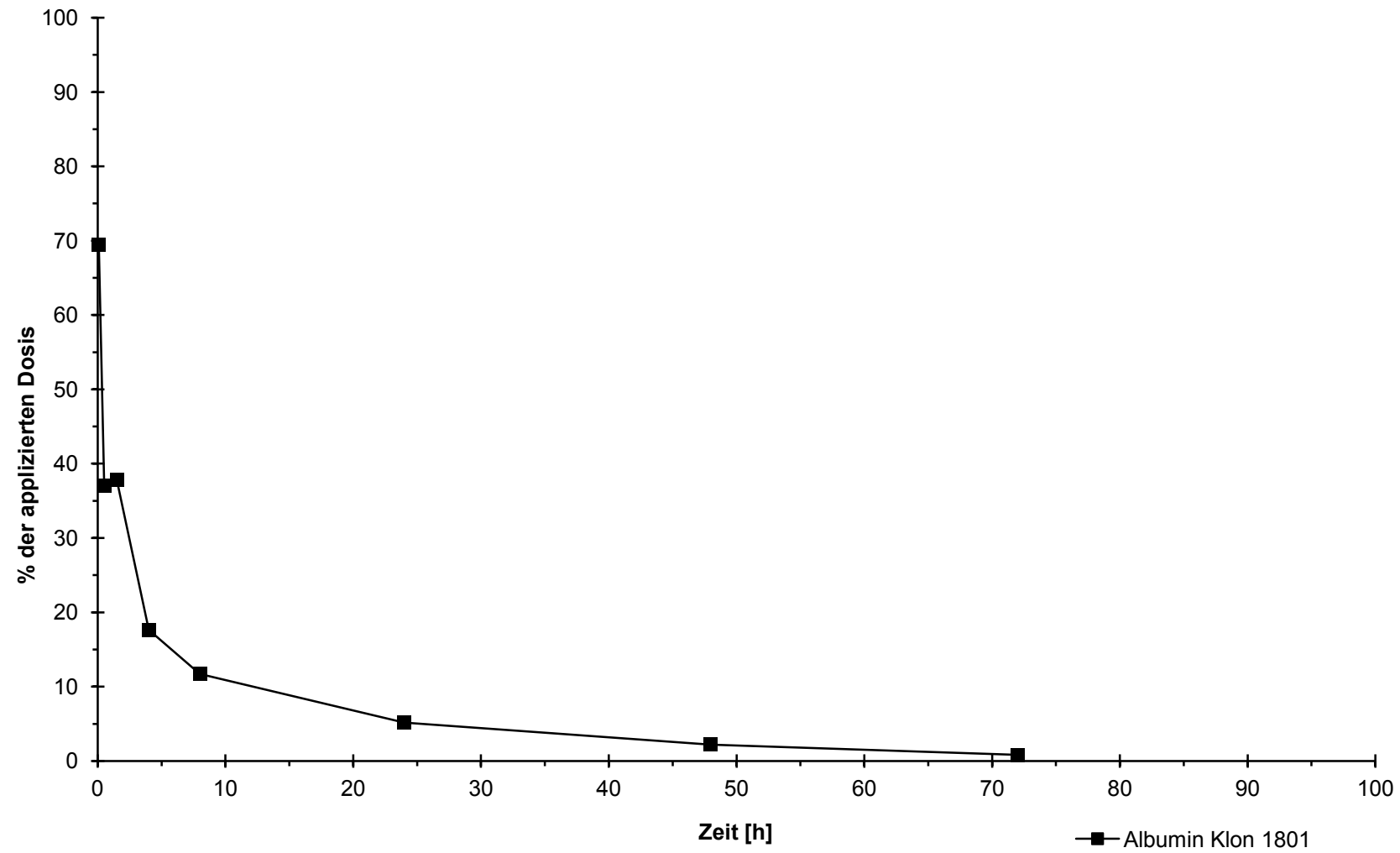


Abb. 7.20: Abbau des Albuminklons 1801 in der Ratte

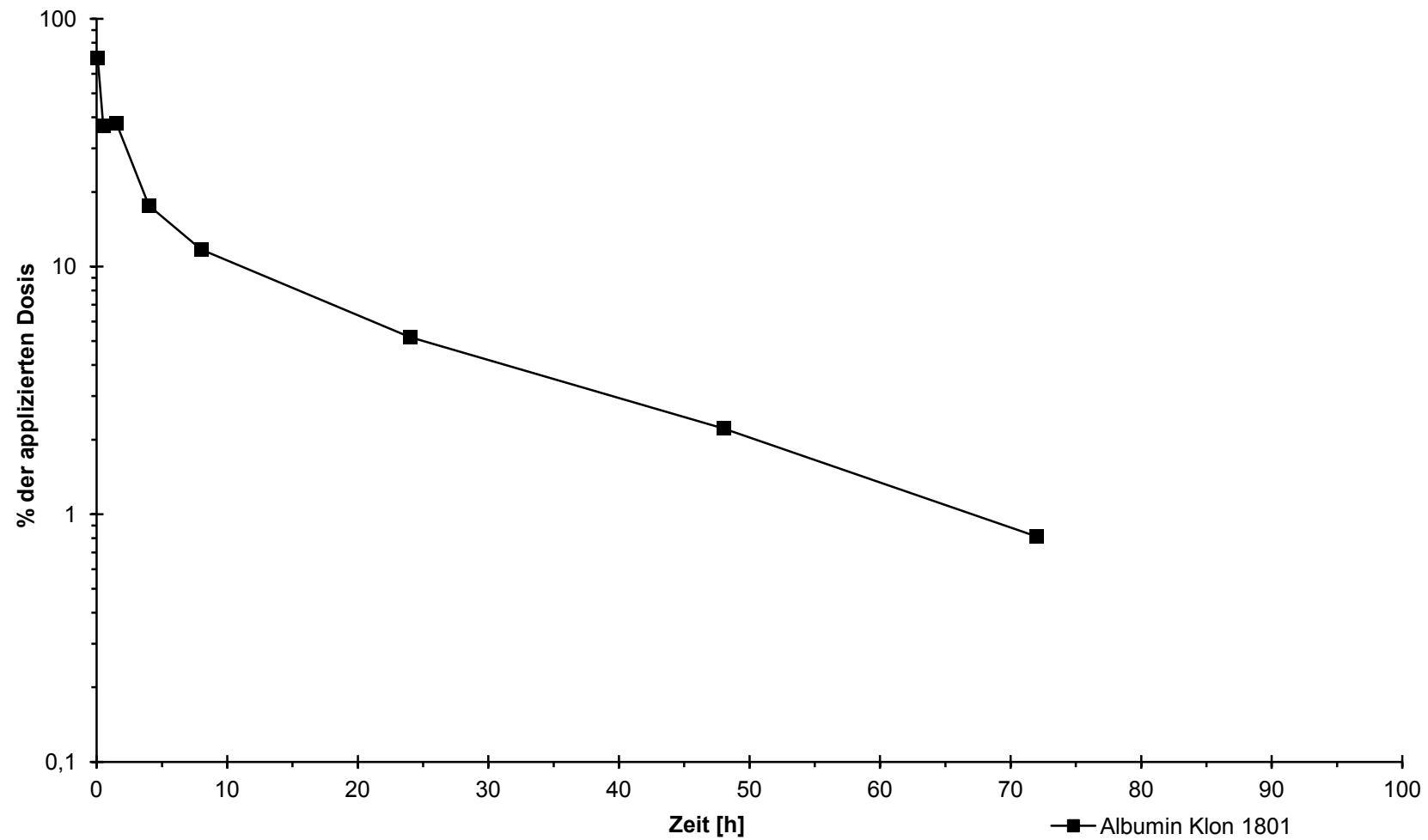


Abb. 7.21: Abbau des Albuminklons 1801 in der Ratte in halblogarithmischer Auftragung

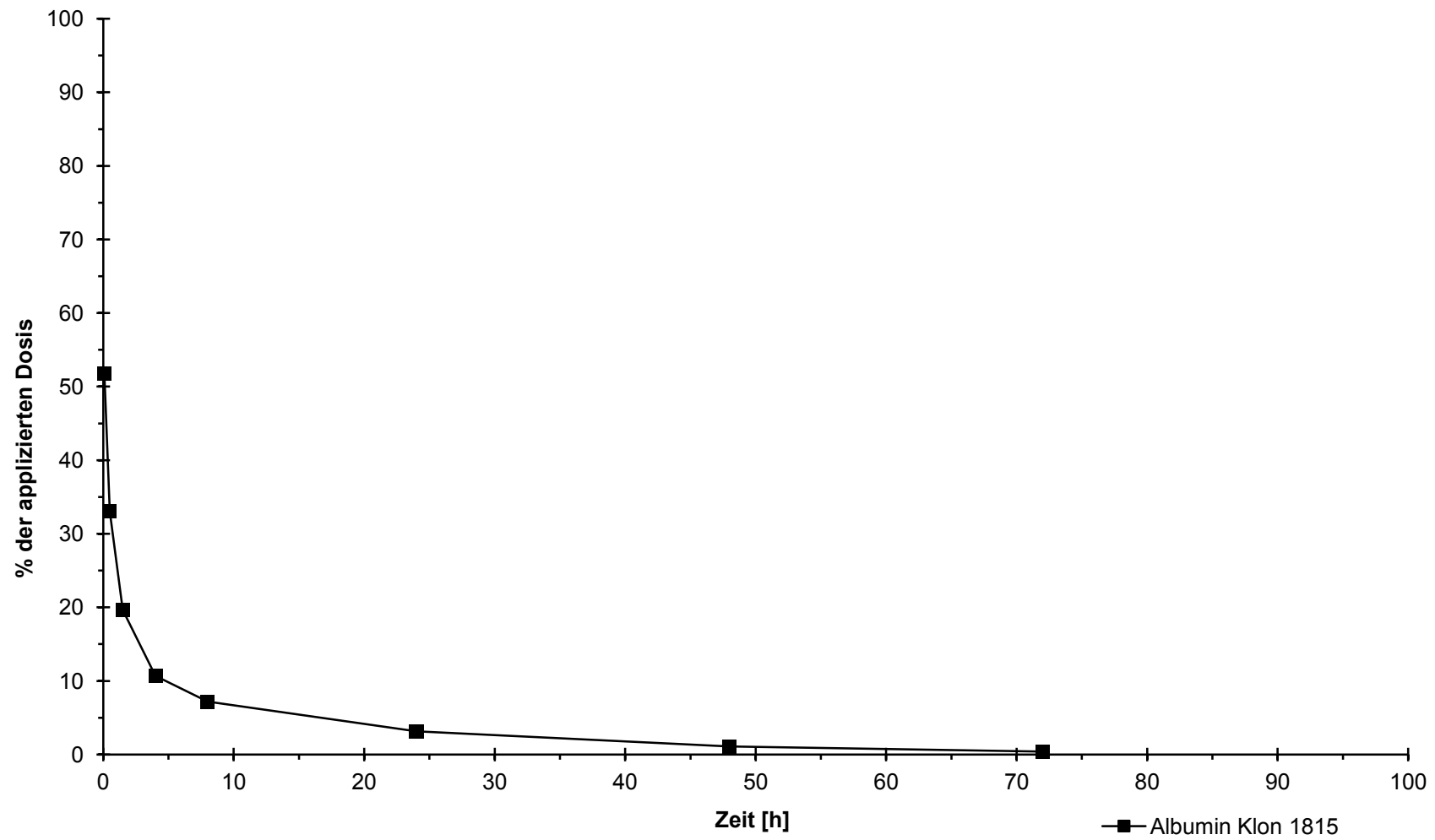


Abb. 7.22: Abbau des Albuminklons 1815 in der Ratte



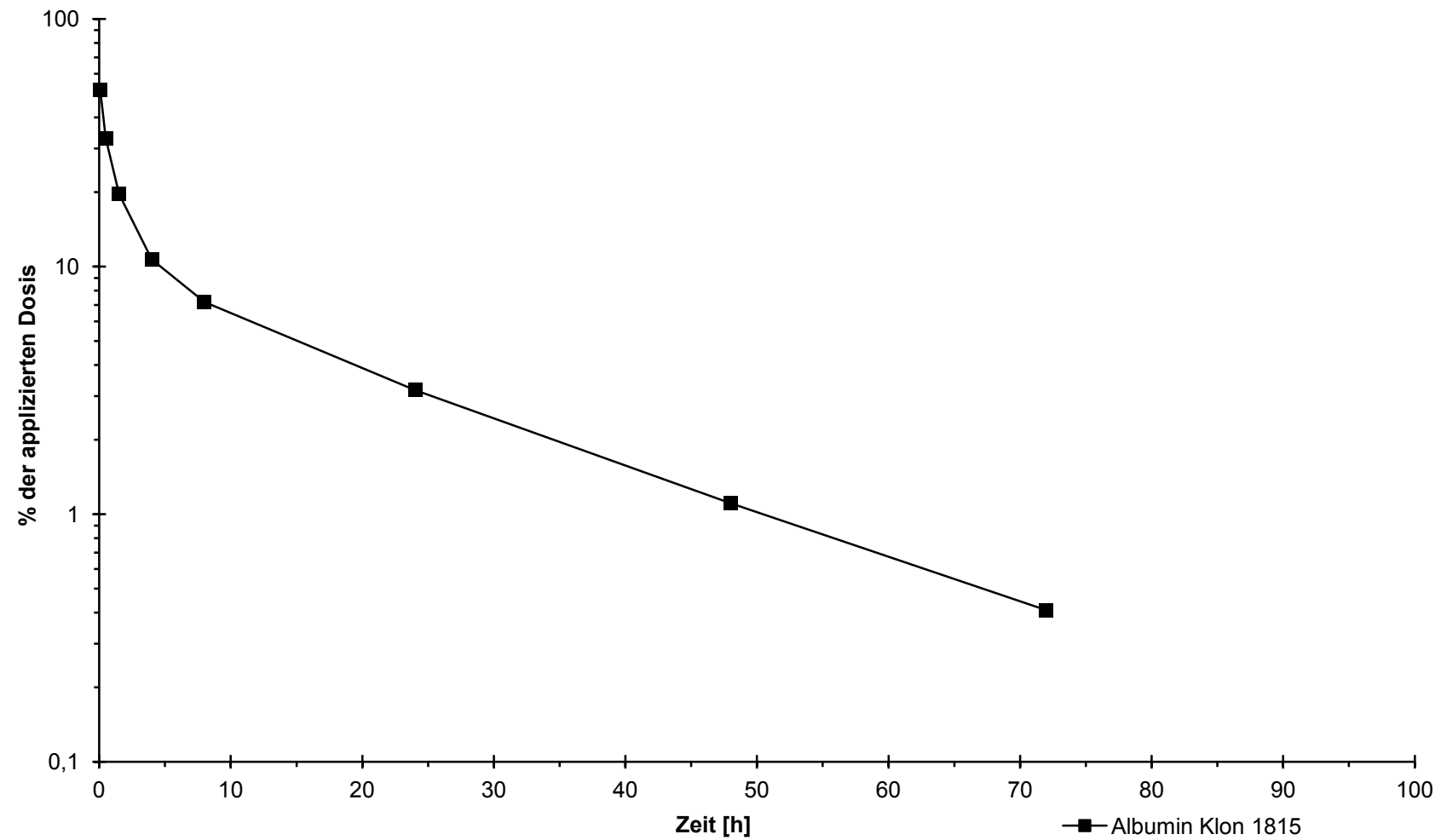


Abb. 7.23: Abbau des Albuminklons 1815 in der Ratte in halblogarithmischer Auftragung

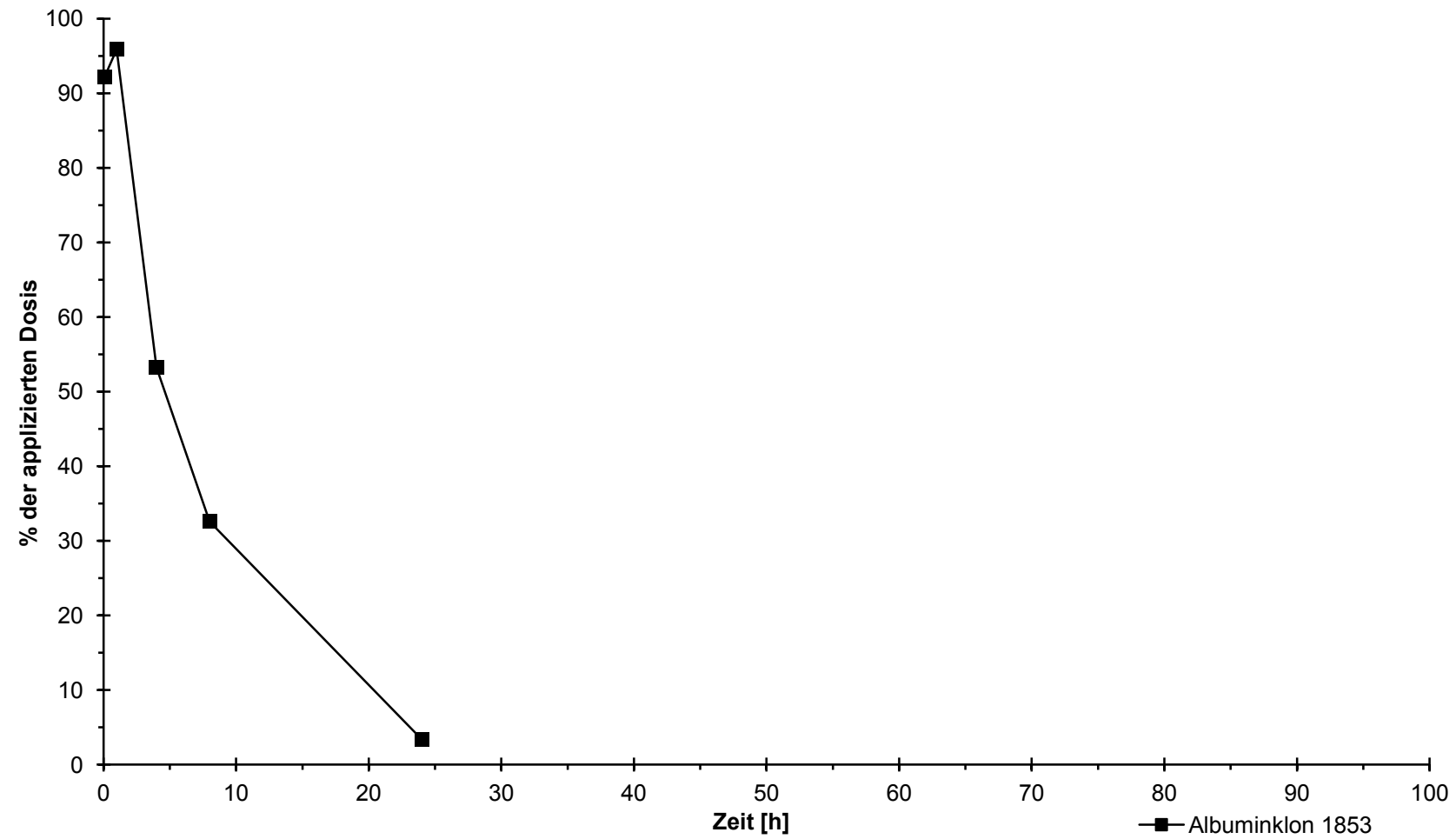


Abb. 7.24: Abbau des Albuminklons 1953 in der Ratte

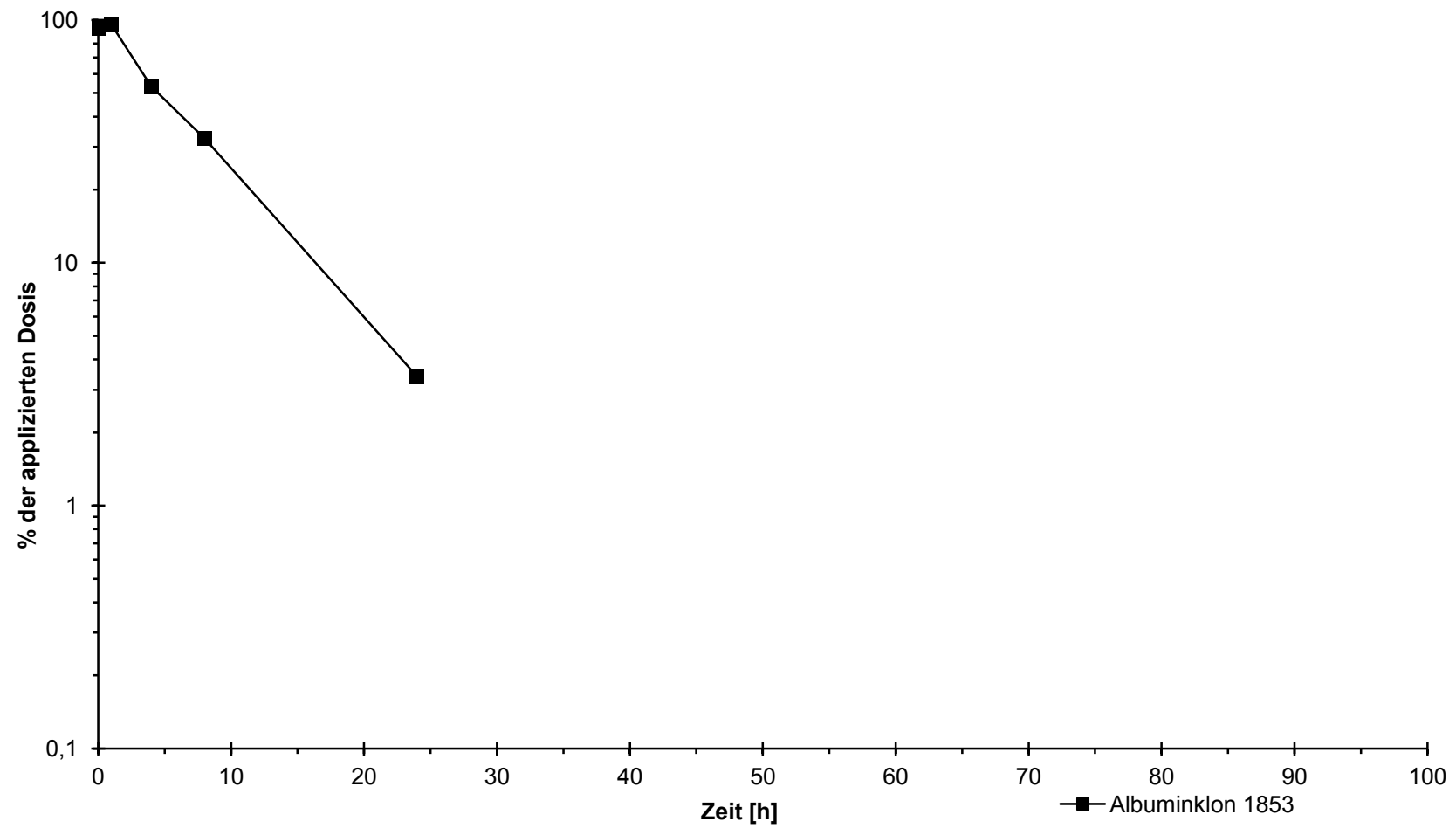


Abb. 7.25: Abbau des Albuminklons 1853 in der Ratte in halblogarithmischer Auftragung

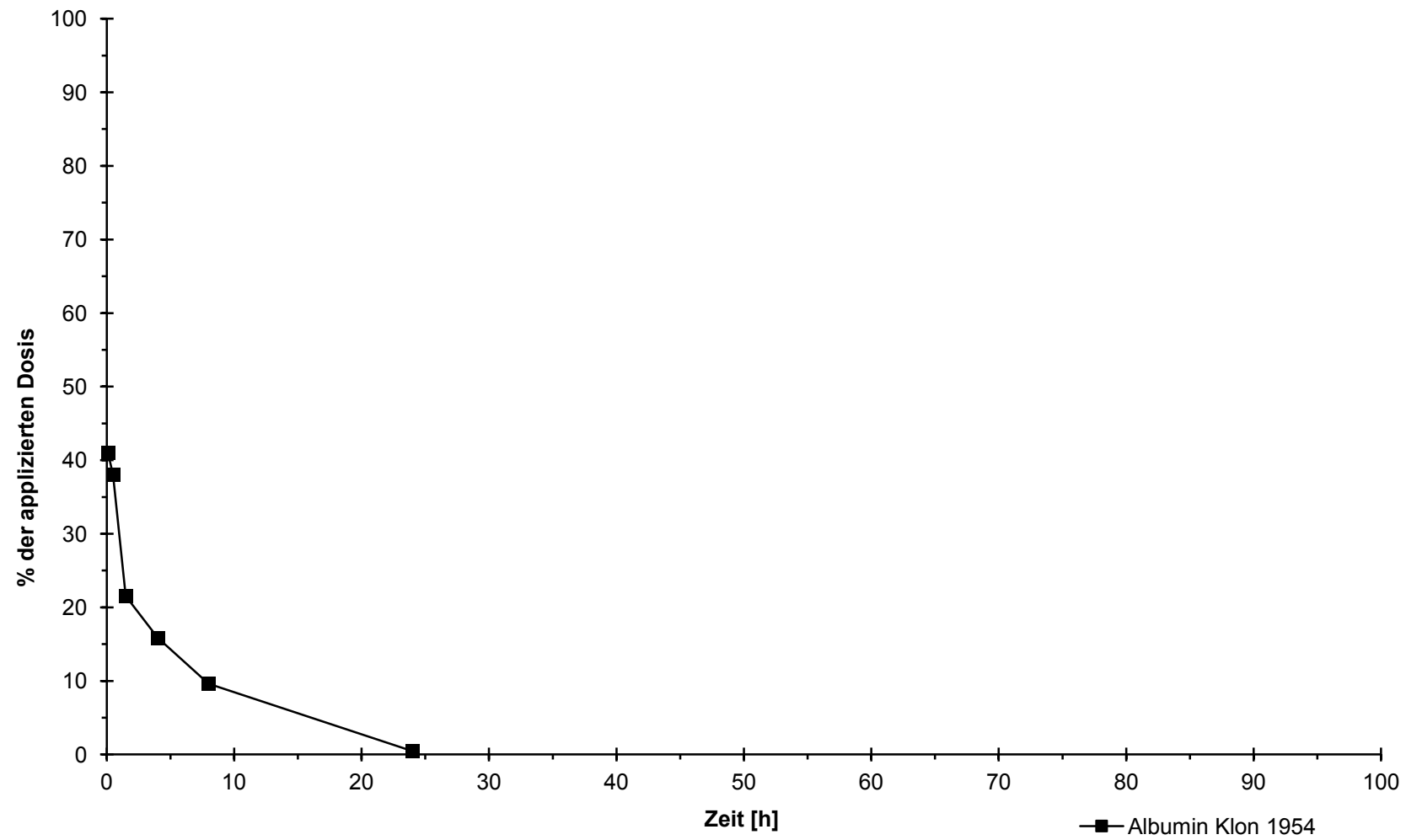


Abb. 7.26: Abbau des Albuminklons 1954 in der Ratte

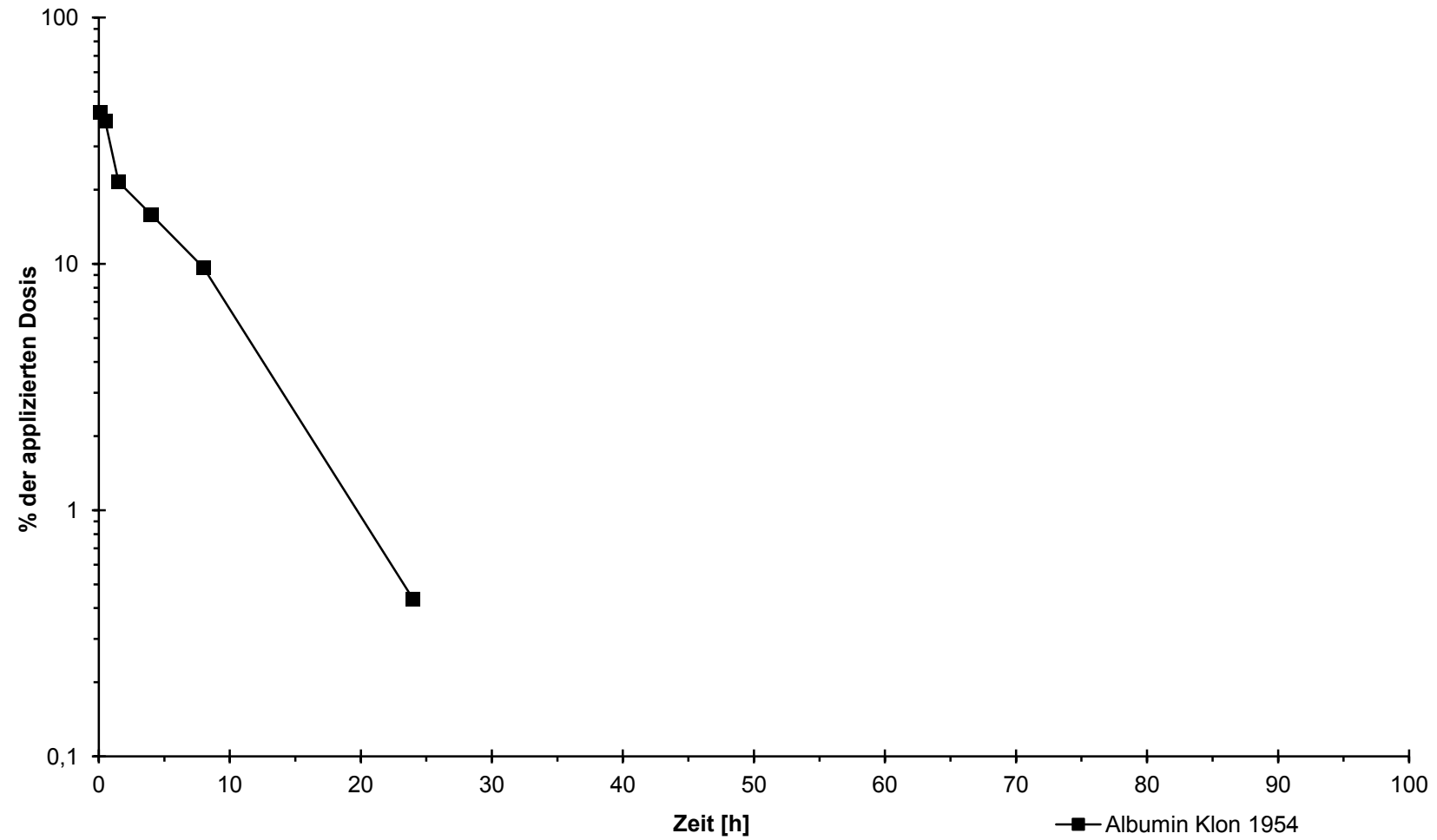


Abb. 7.27: Abbau des Albuminklons 1954 in der Ratte in halblogarithmischer Auftragung

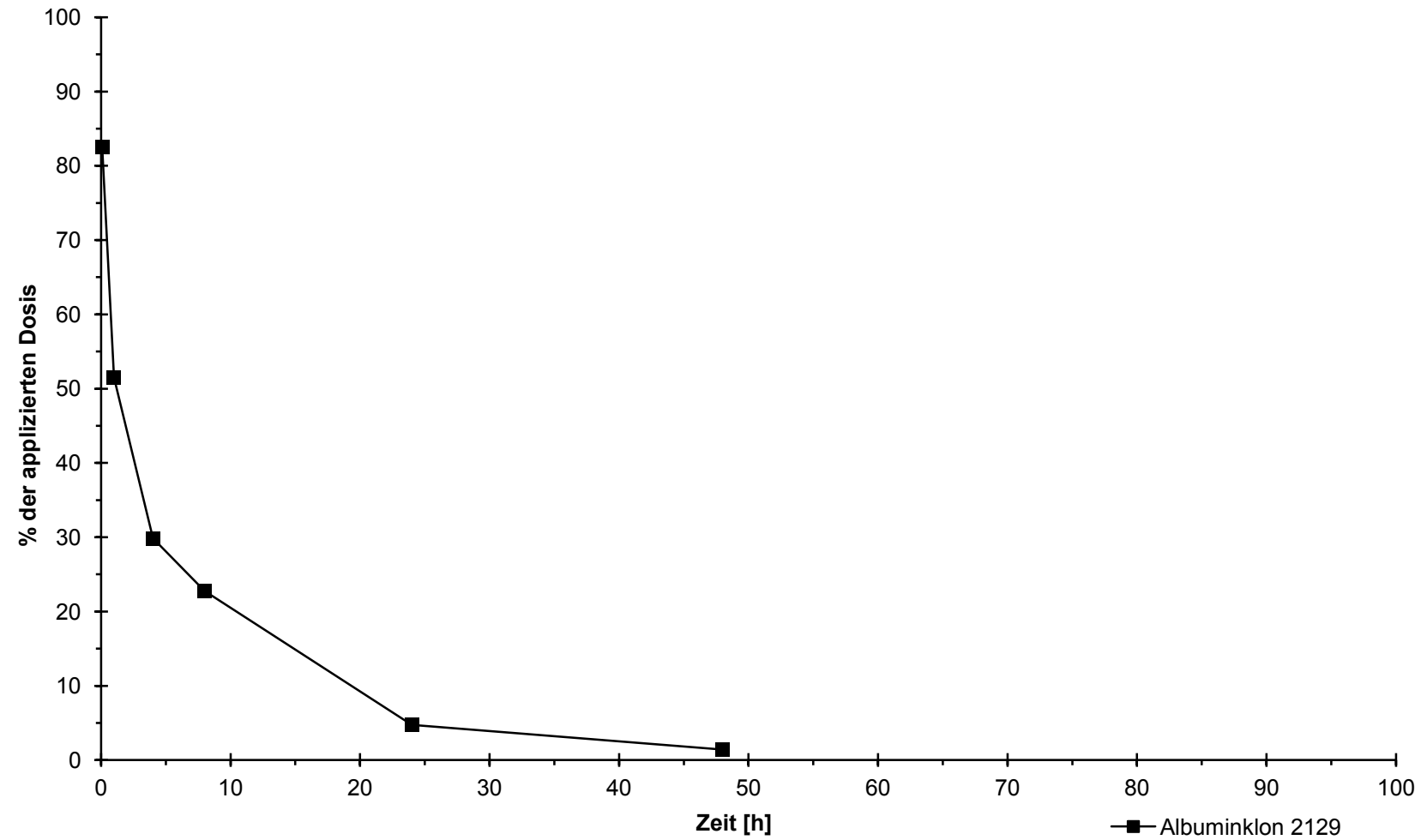


Abb. 7.28: Abbau des Albuminklons 2129 in der Ratte

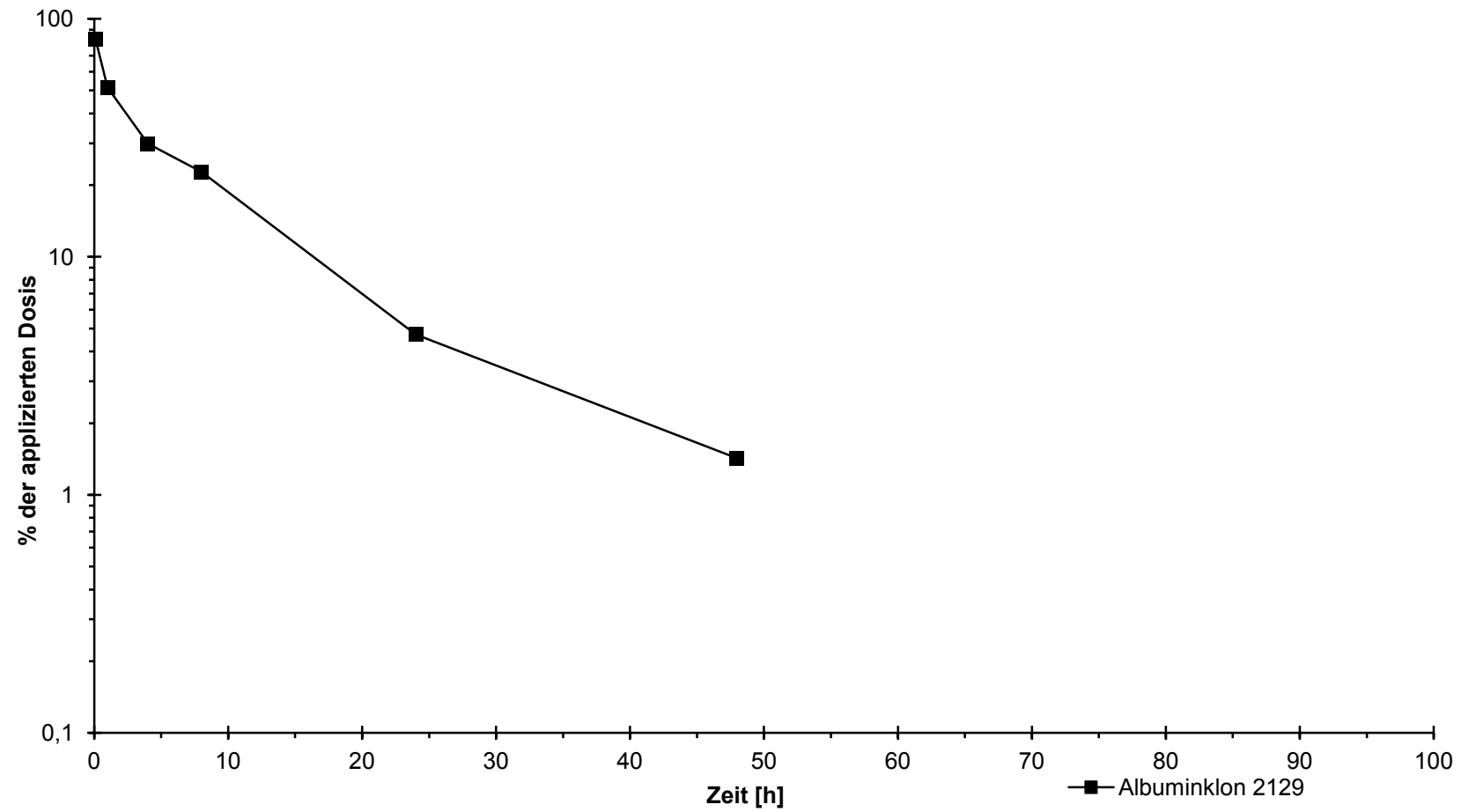


Abb. 7.29: Abbau des Albuminklons 2129 in der Ratte in halblogarithmischer Auftragung

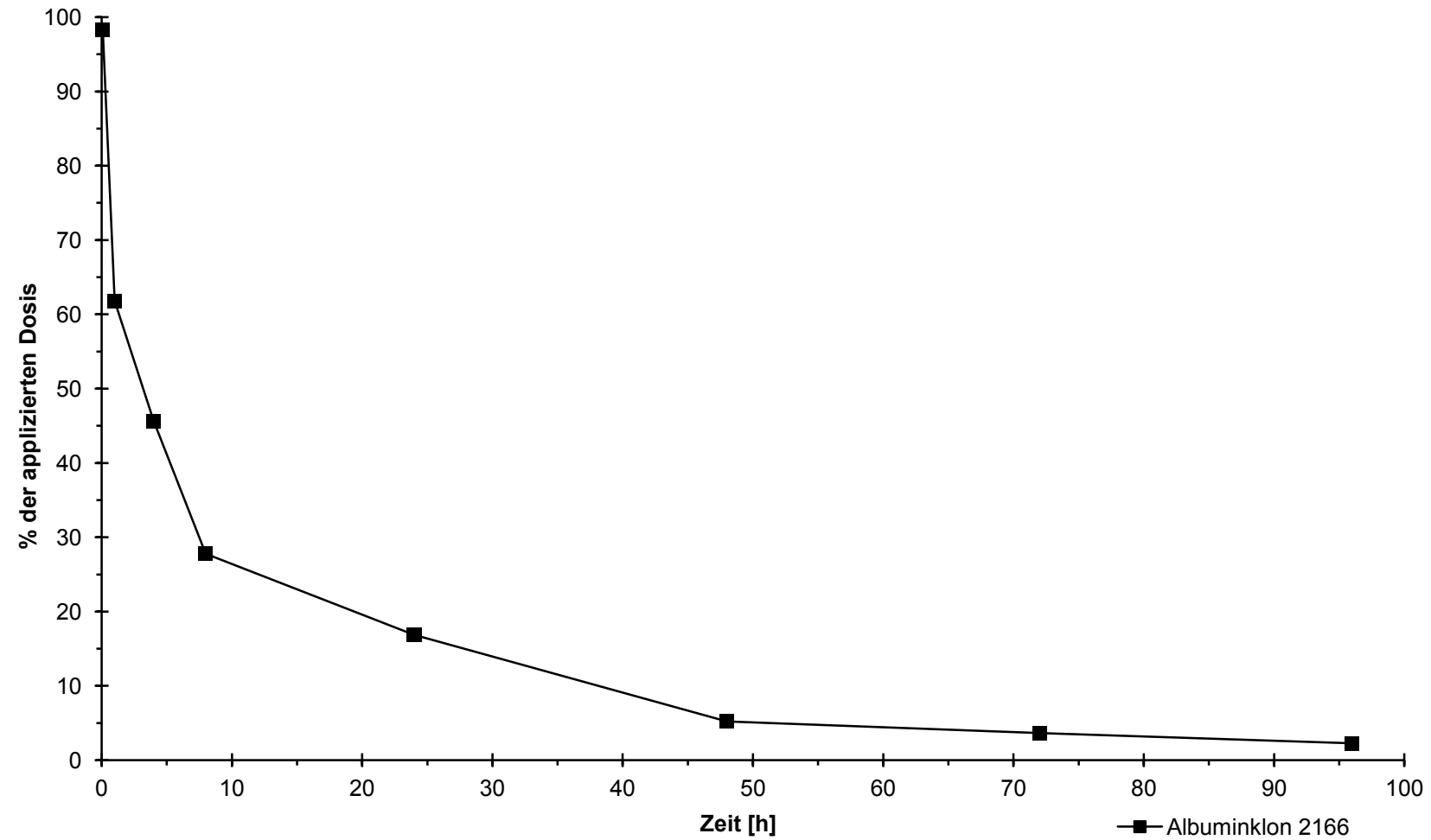


Abb. 7.30: Abbau des Albuminklons 2166 in der Ratte



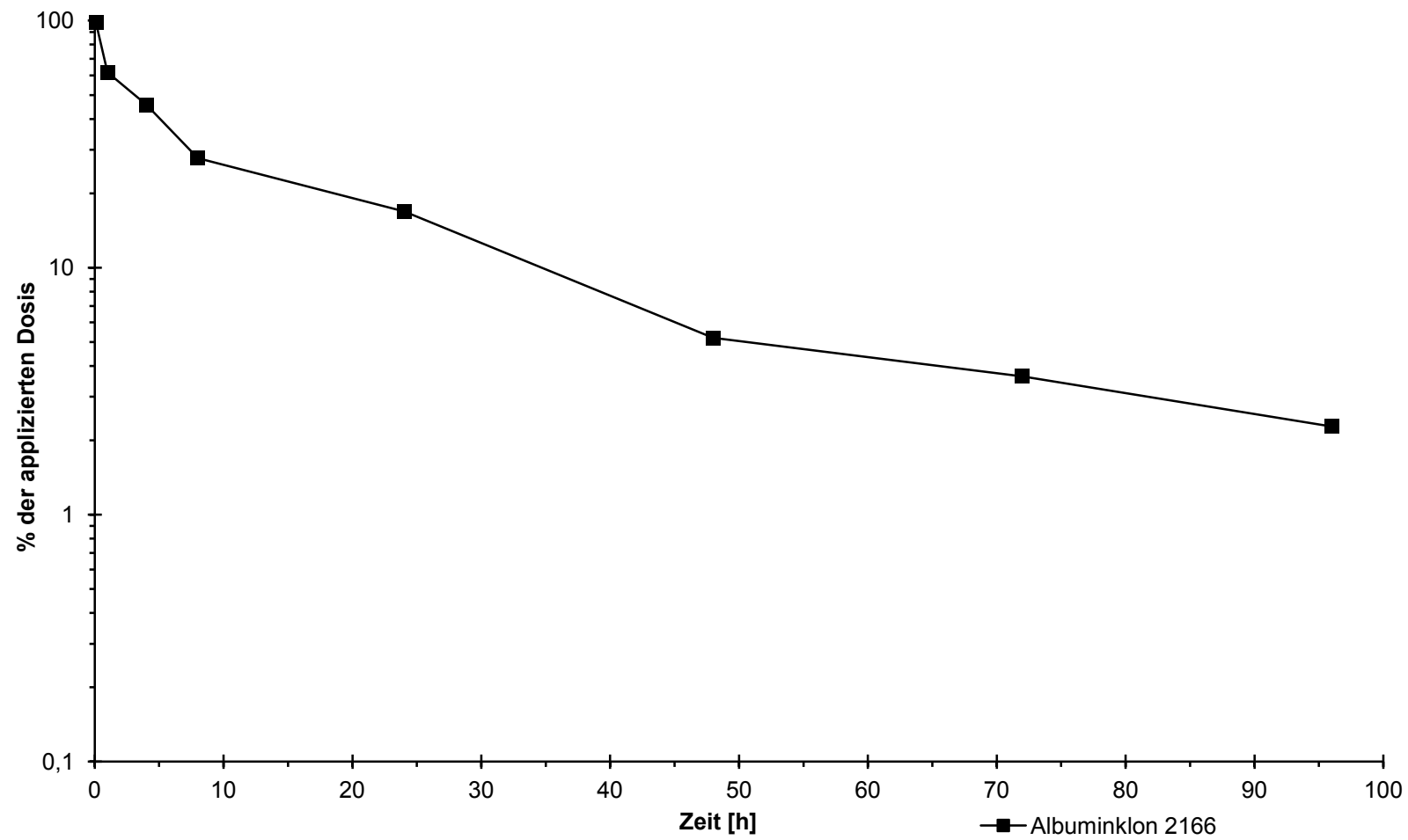


Abb. 7.31: Abbau des Albuminklons 2166 in der Ratte in halblogarithmischer Auftragung

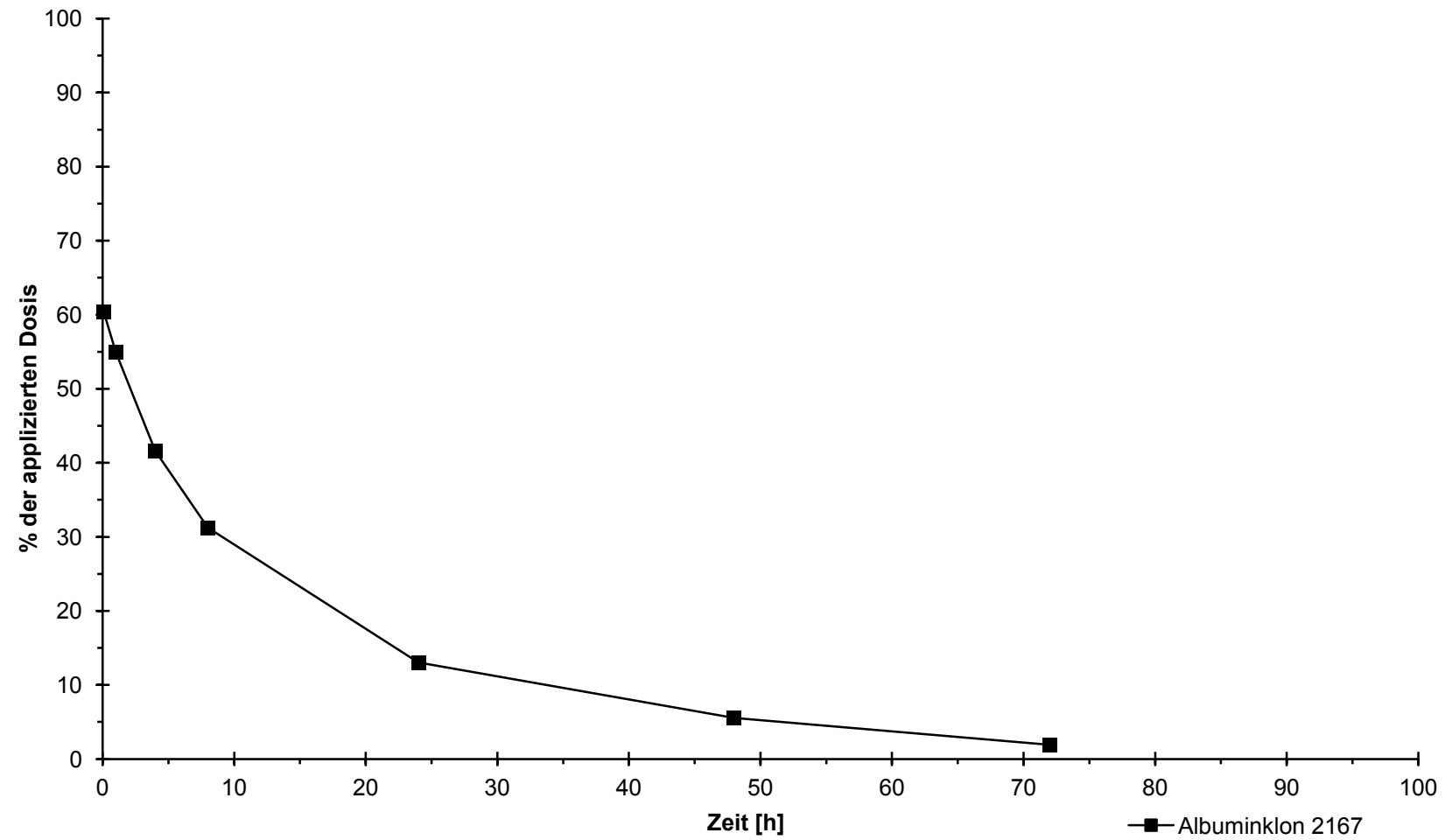


Abb. 7.32: Abbau des Albuminklons 2167 in der Ratte

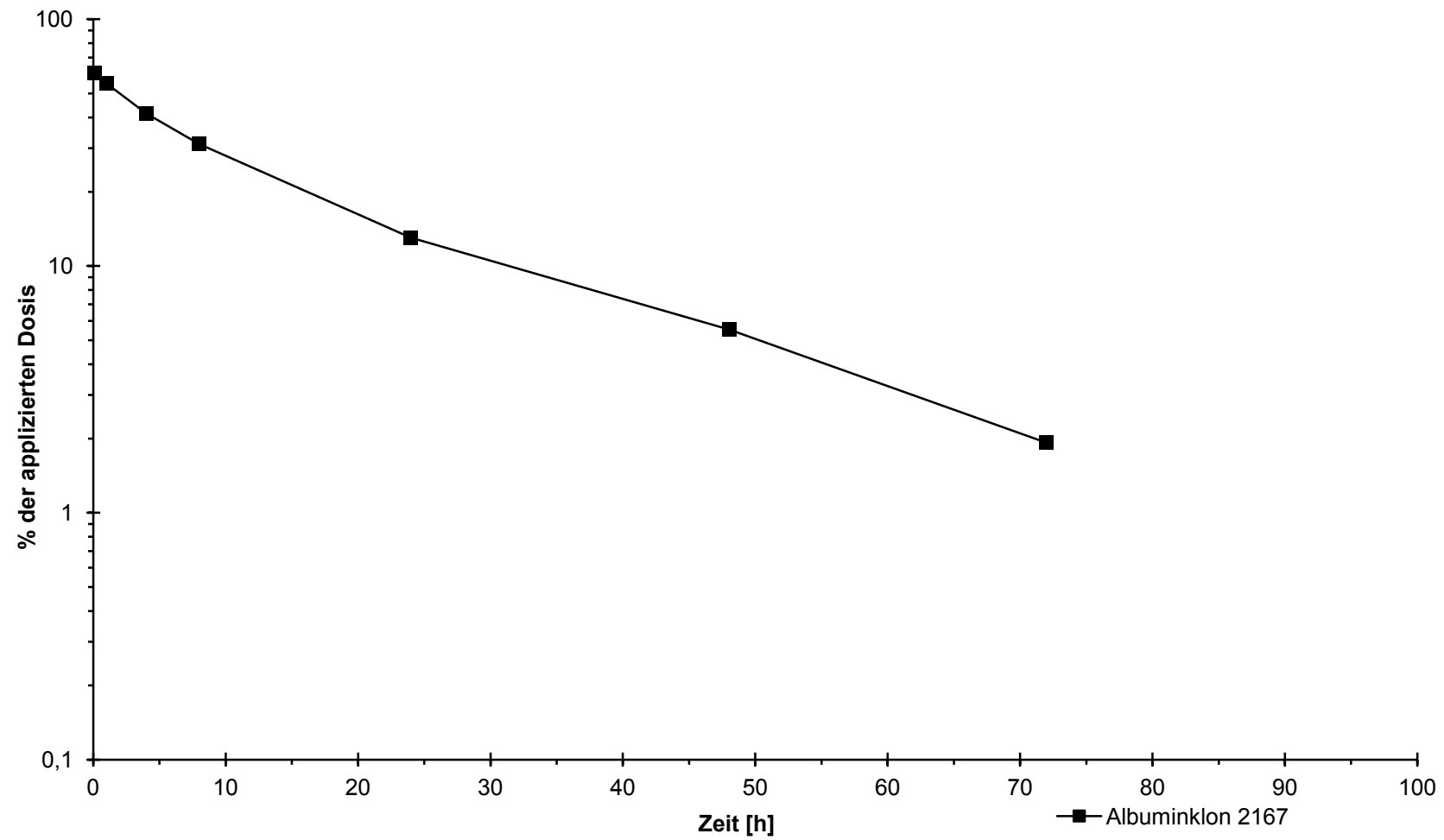


Abb. 7.33: Abbau des Albuminklons 2167 in der Ratte in halblogarithmischer Auftragung

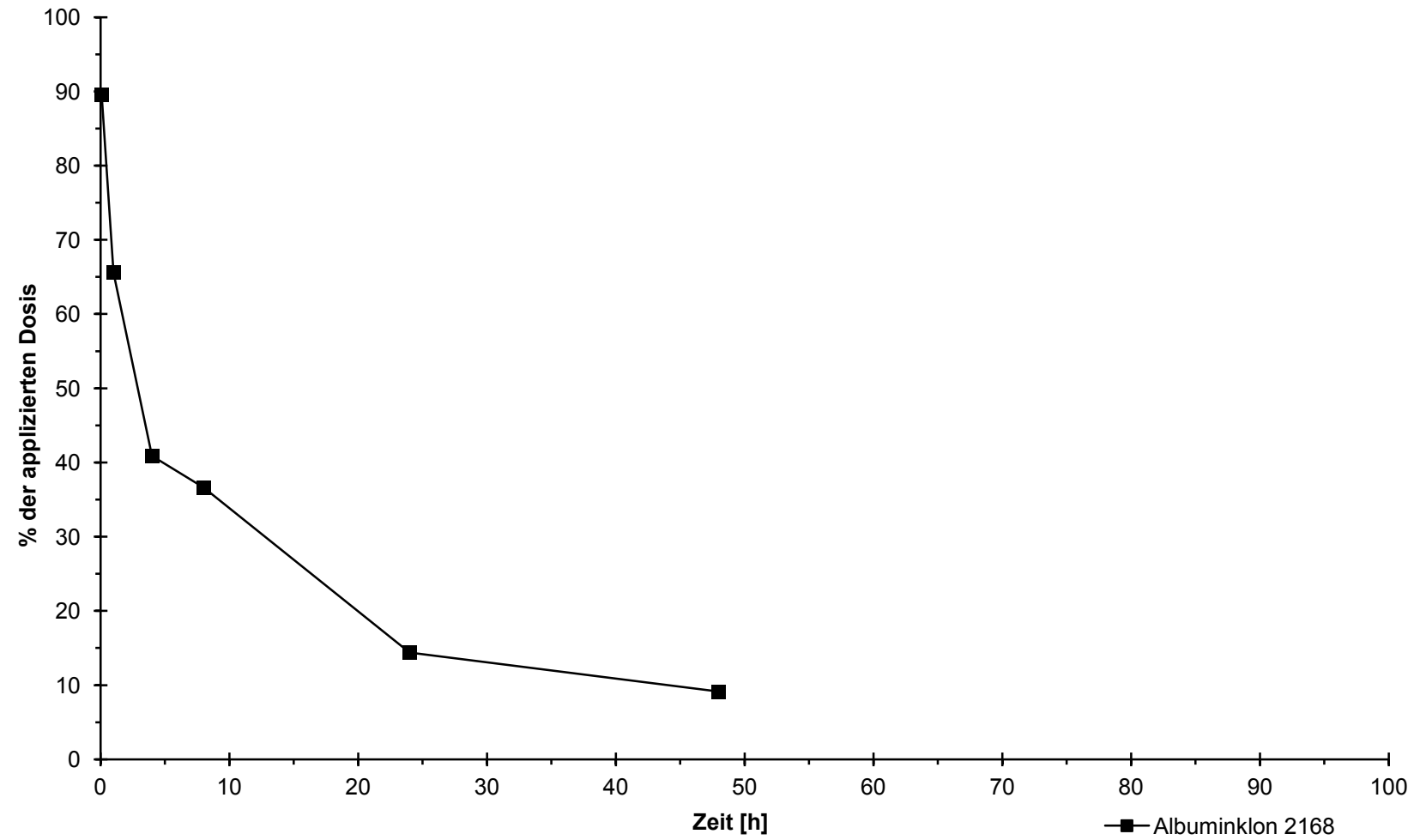


Abb. 7.34: Abbau des Albuminklons 2168 in der Ratte

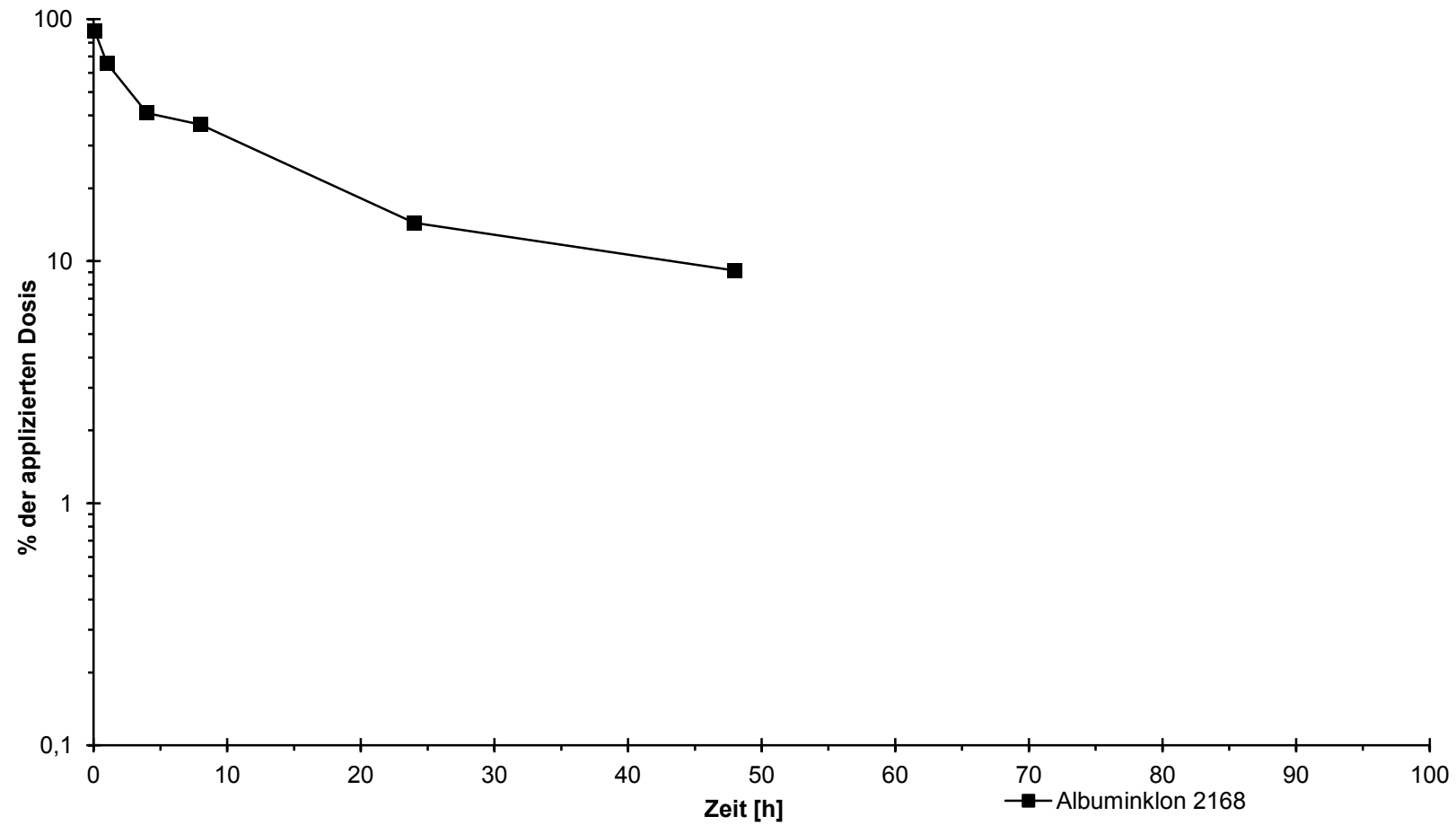


Abb. 7.35: Abbau des Albuminklons 2168 in der Ratte in halblogarithmischer Auftragung

Tab.: 7.2: Übersicht der bestimmten Parameter der Abbaukinetiken in der Ratte

Albumin Klon Nr.	Wiederfin- dungsrate [%]	Halbwerts- Zeit [h]	AUC (0-t <sub>end</sub> ) [h*ng/mL]	Eliminierungsrate
<b>Wildtyp</b>	45,2	14,00	662	0,0528
<b>1796</b>	65,8	12,98	824	0,0575
<b>1797</b>	66,0	14,90	728	0,0534
<b>1798</b>	48,2	6,27	294	0,1106
<b>1800</b>	34,2	16,09	505	0,0476
<b>1801</b>	69,5	15,99	458	0,0547
<b>1815</b>	51,8	14,82	465	0,0594
<b>1853</b>	92,2	4,87	190	0,1422
<b>1954</b>	41,0	3,81	144	0,1843
<b>2129</b>	82,5	6,96	265	0,0996
<b>2166</b>	98,3	13,18	665	0,0528
<b>2167</b>	60,4	11,44	644	0,0605
<b>2168</b>	89,5	11,39	723	0,0608

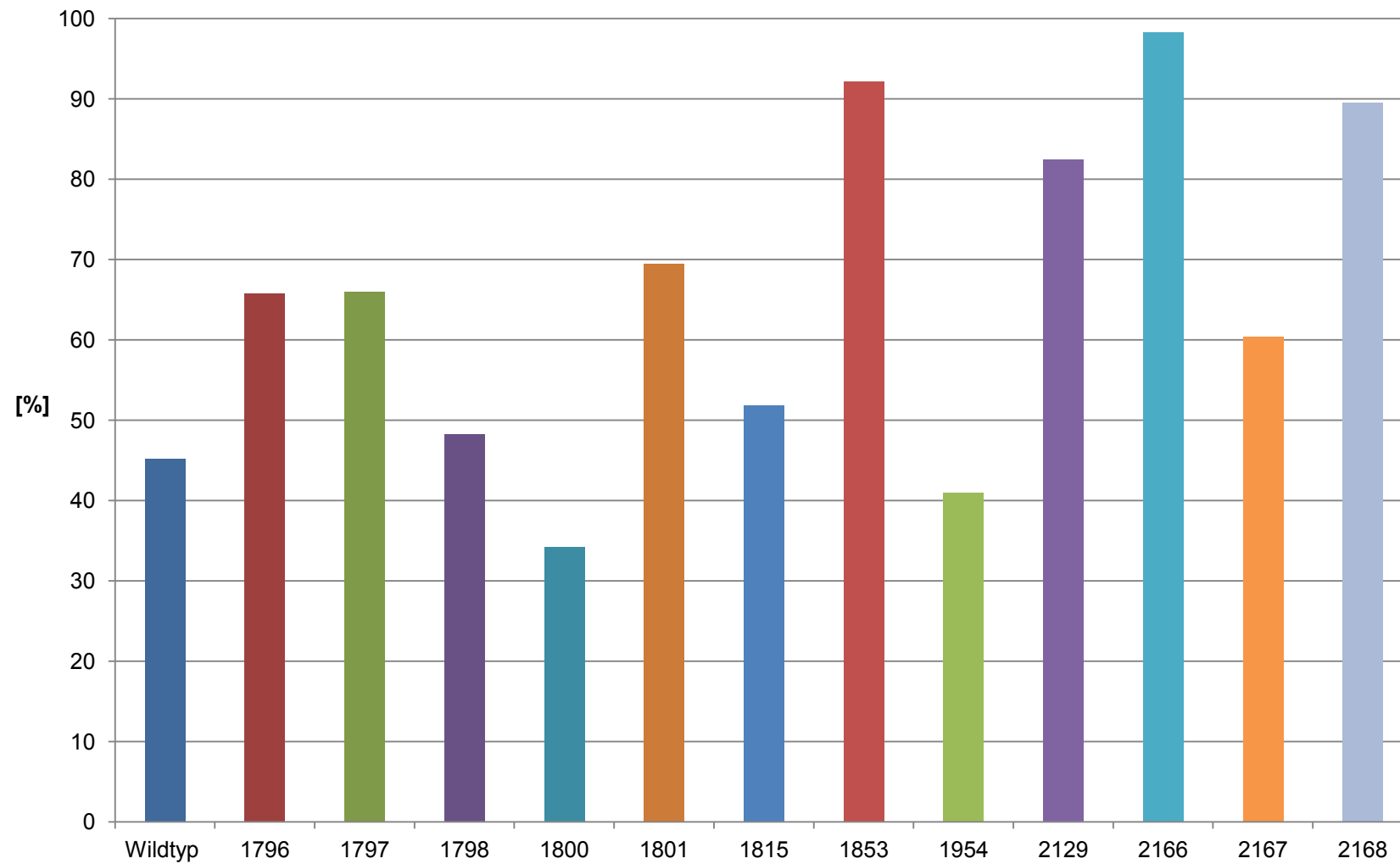


Abb. 7.36: Übersicht über die Wiederfindungsraten in der Ratte, aller applizierten Albuminvarianten

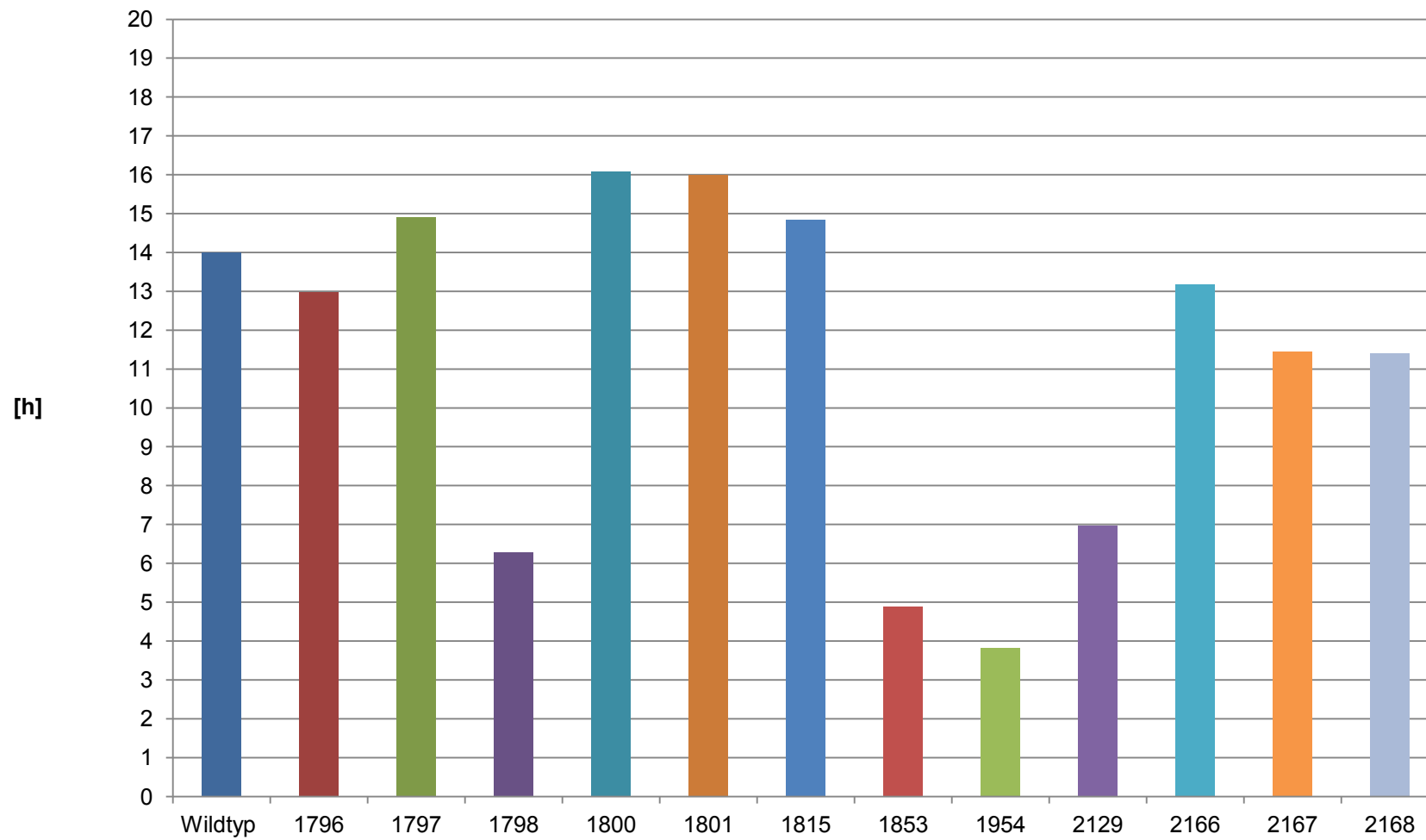


Abb. 7.37: Übersicht über die Halbwertszeiten in der Ratte, aller applizierten Albuminvarianten



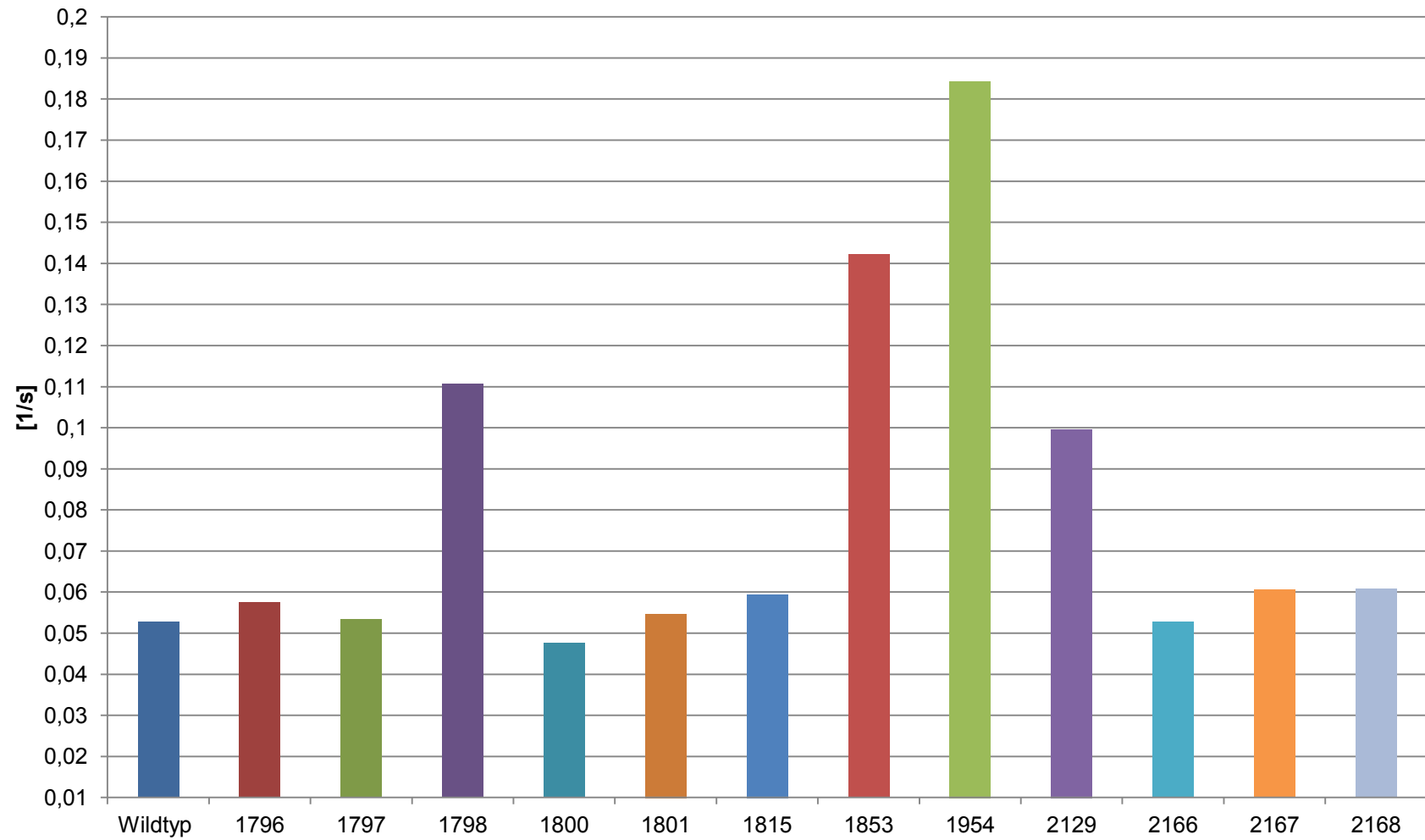


Abb. 7.38: Übersicht über die Eliminierungsraten in der Ratte, aller applizierten Albuminvarianten

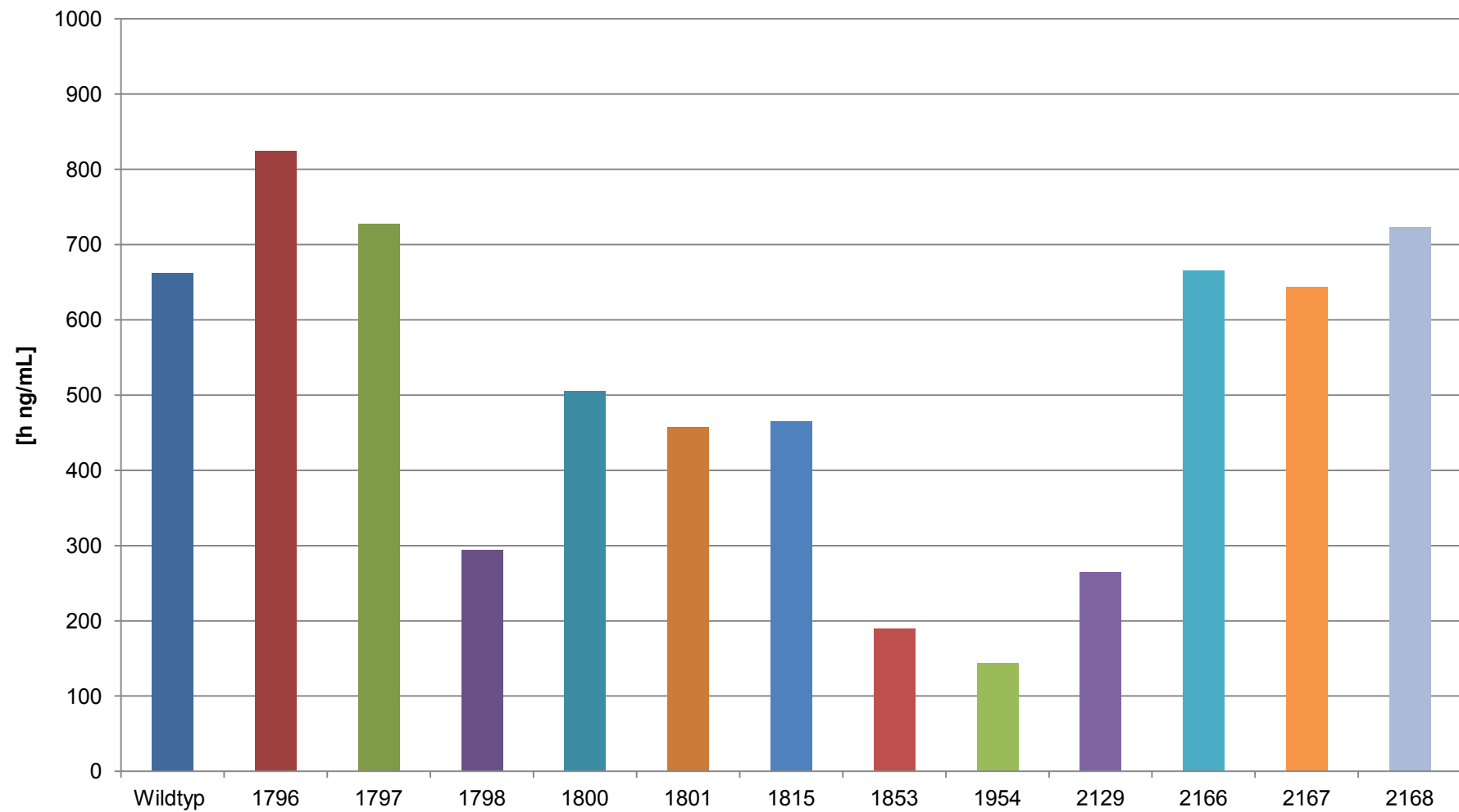


Abb. 7.39: Übersicht über die Bioverfügbarkeiten in der Ratte, aller applizierten Albuminvarianten

## 7.9 Graphen zur surface plasmon resonance

### 7.9.1 Graphen zu den Elektrostatiken

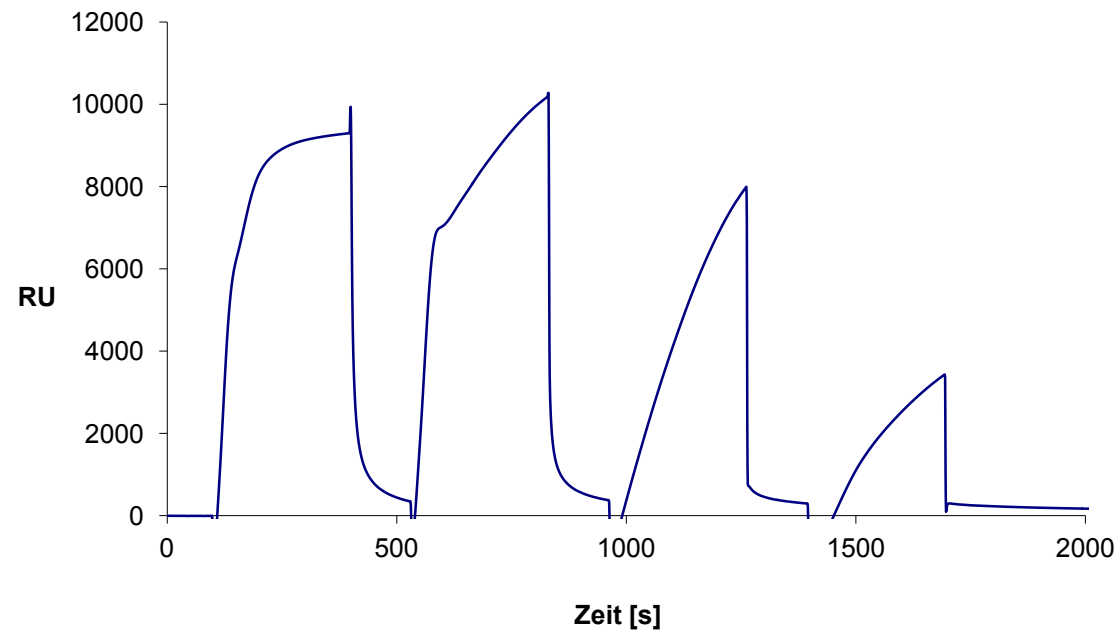


Abb. 7.40: Elektrostatik von FcRn am CM3 chip bei den pH 4, pH 4,5, pH 5, pH 5,5, das stärksteSignal wurde bei pH 4,5 mit 10100 *response units* erreicht

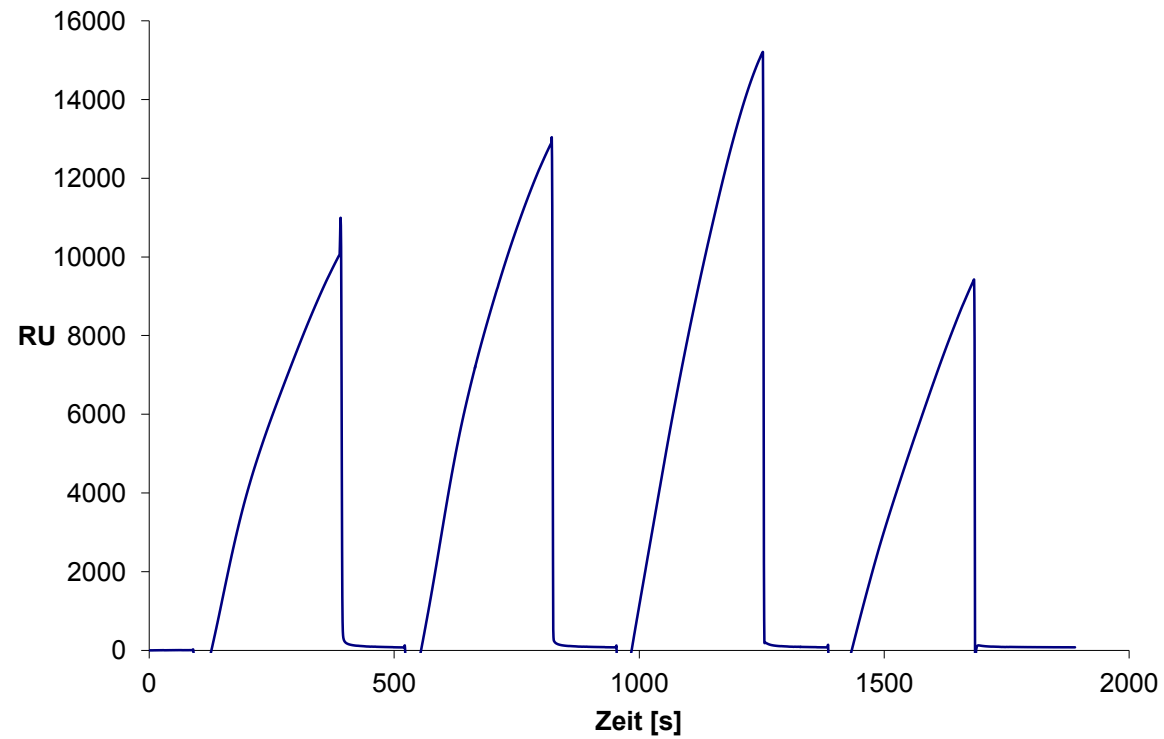


Abb. 7.41: Elektrostatik von rHA-wt am CM3 chip bei den pH4, pH4,5, pH5, pH5,5. das stärksteSignal wurde bei pH 5 mit 15200 *response units* erreicht

### 7.9.2 Immobilisierung von Albumin am CM3 Chip

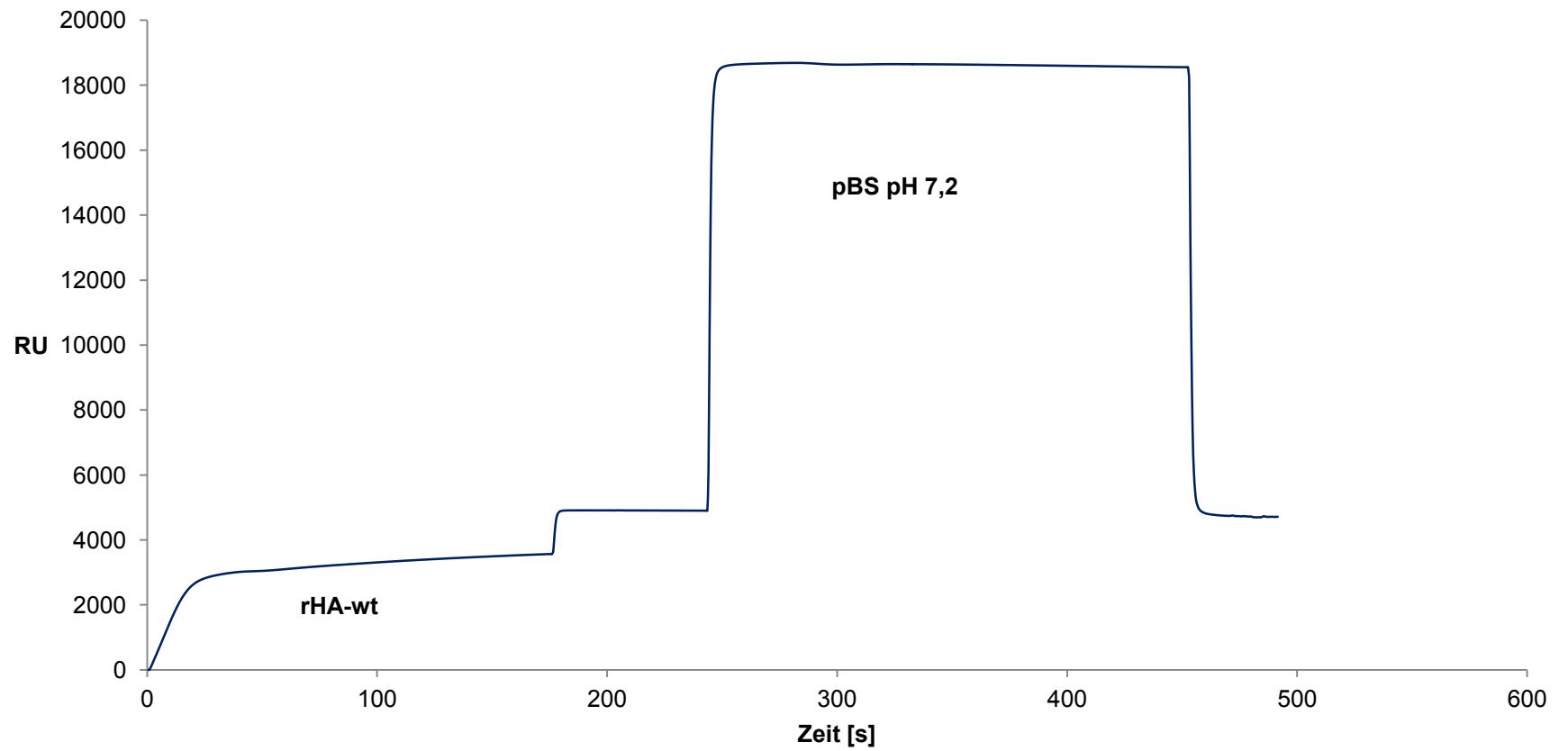


Abb. 7.42: Immobilisierung von rHA-wt an einen CM 3 Chip, es konnte Albumin mit in einer Menge entsprechend 4700 *response units* gebunden werden

### 7.9.3 Graphen zur Berechnungen der Kinetiken IgG in der mobilen Phase an gekoppeltem FcRn

Im Folgenden sind die Graphen zur Berechnung der  $K_a$ - und  $k_d$ -Werte von Bindungen zwischen FcRn zu IgG, HSA

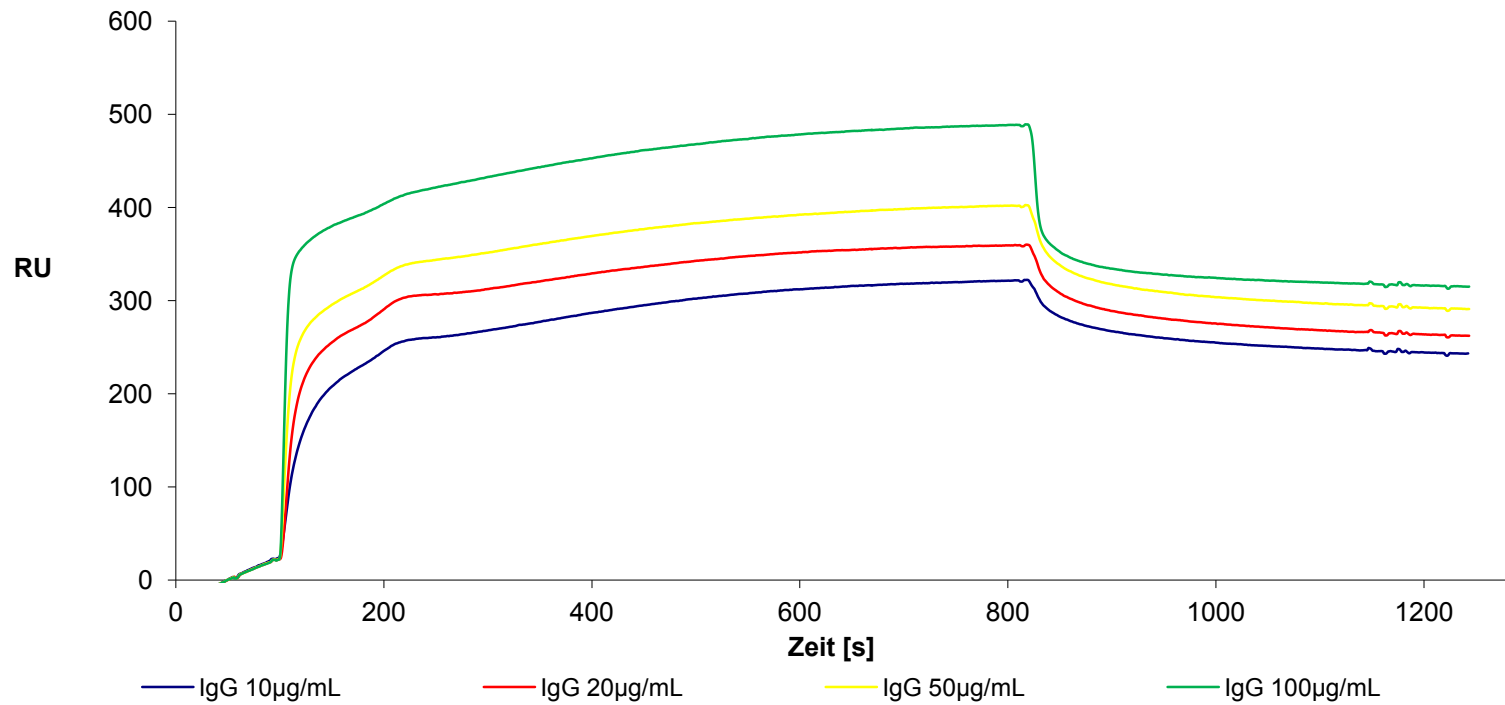


Abb. 7.43: IgG (Vivaglobin) in versch. Konz. in moblier Phase, in fester Phase FcRn

#### 7.9.4 HSA in der mobilen Phase an gekoppeltem FcRn zur Berechnung von Kinetiken

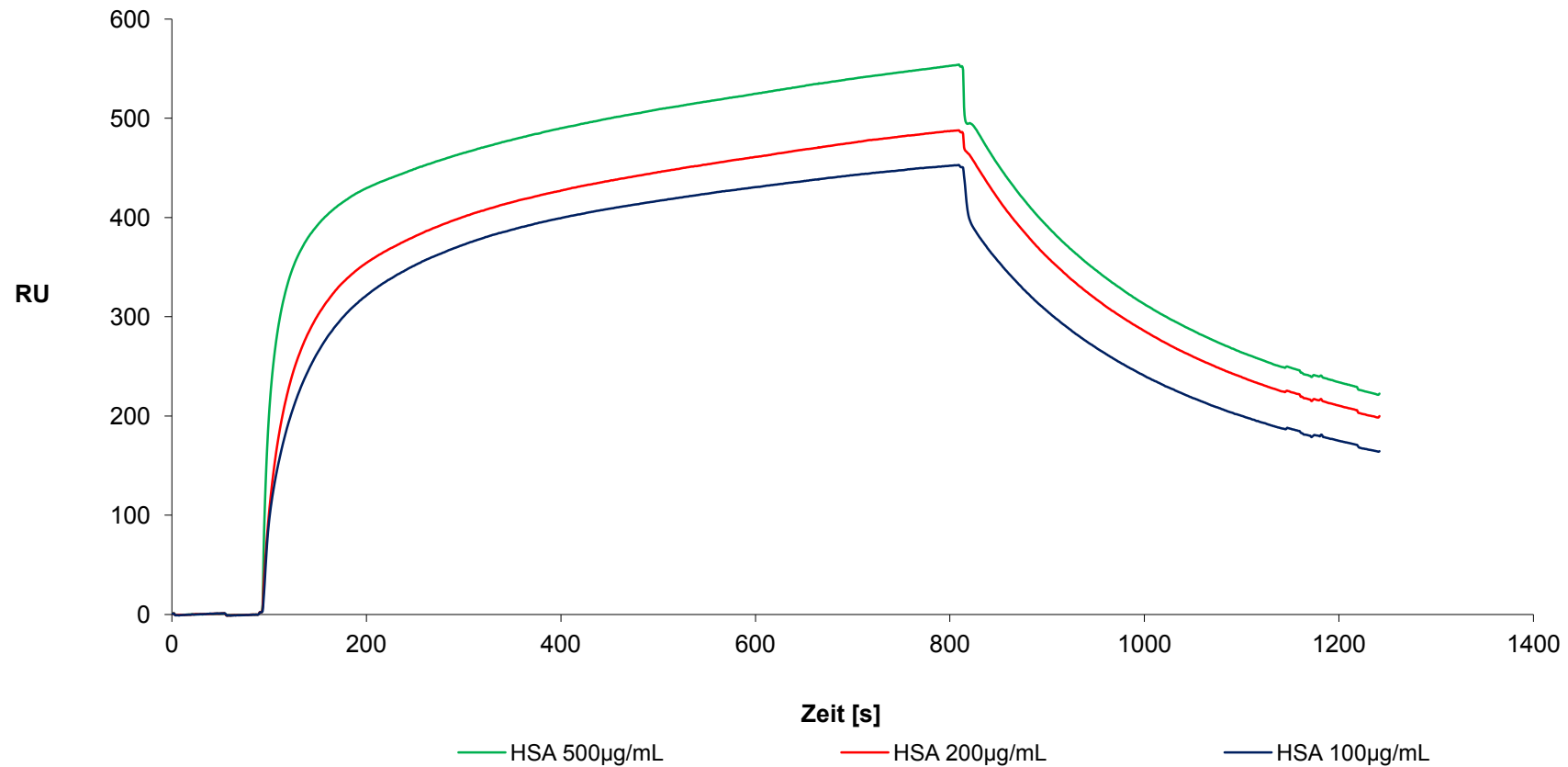
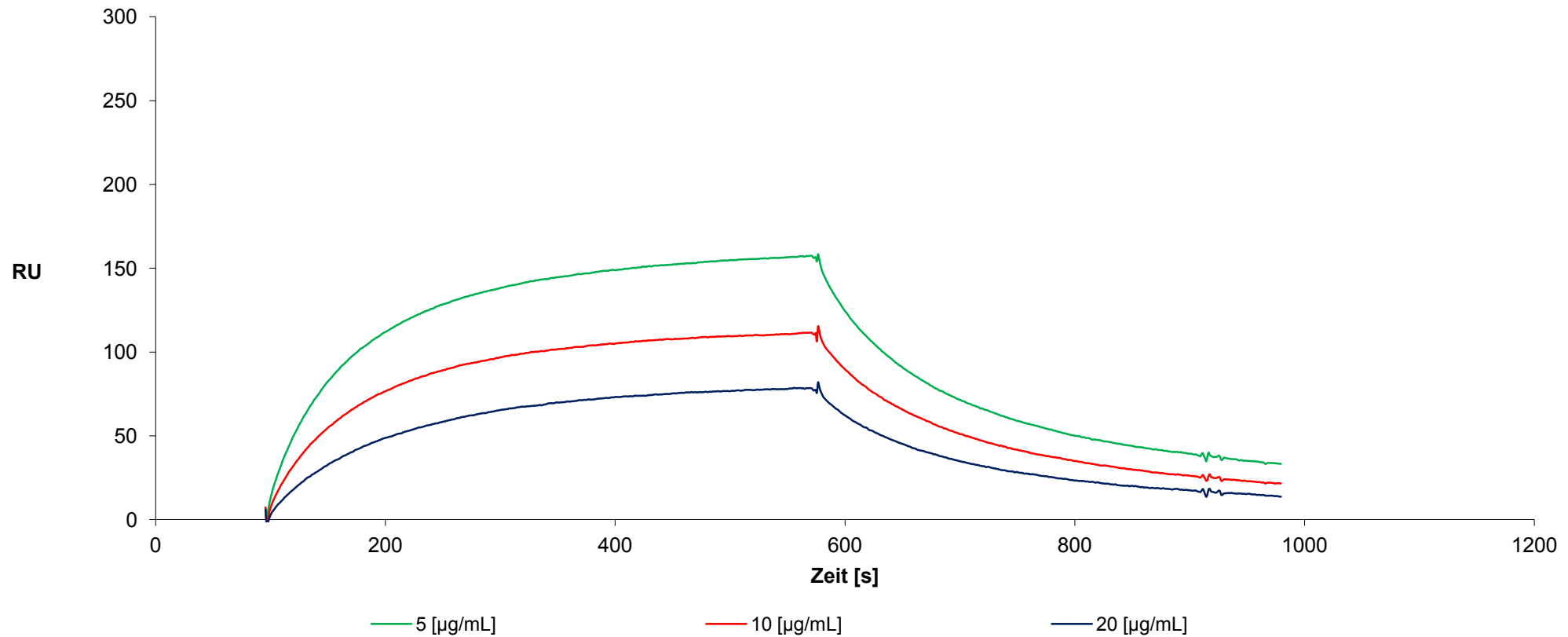


Abb. 7.44: HSA in versch. Konz. in moblier Phase, in fester Phase FcRn

**7.9.5 Die alaninisierten Albumin Mutanten 1796,1797,1800,1801 zeigen in Ihrem Bindungsverhalten eine starke Ähnlichkeit zu dem des wildtyp Albumins**



**Abb. 7.45: FcRn in mobiler Phase, Albuminvariante 1796 in der Festphase, Bindungsverhalten vergleichbar mit wt-rHA**



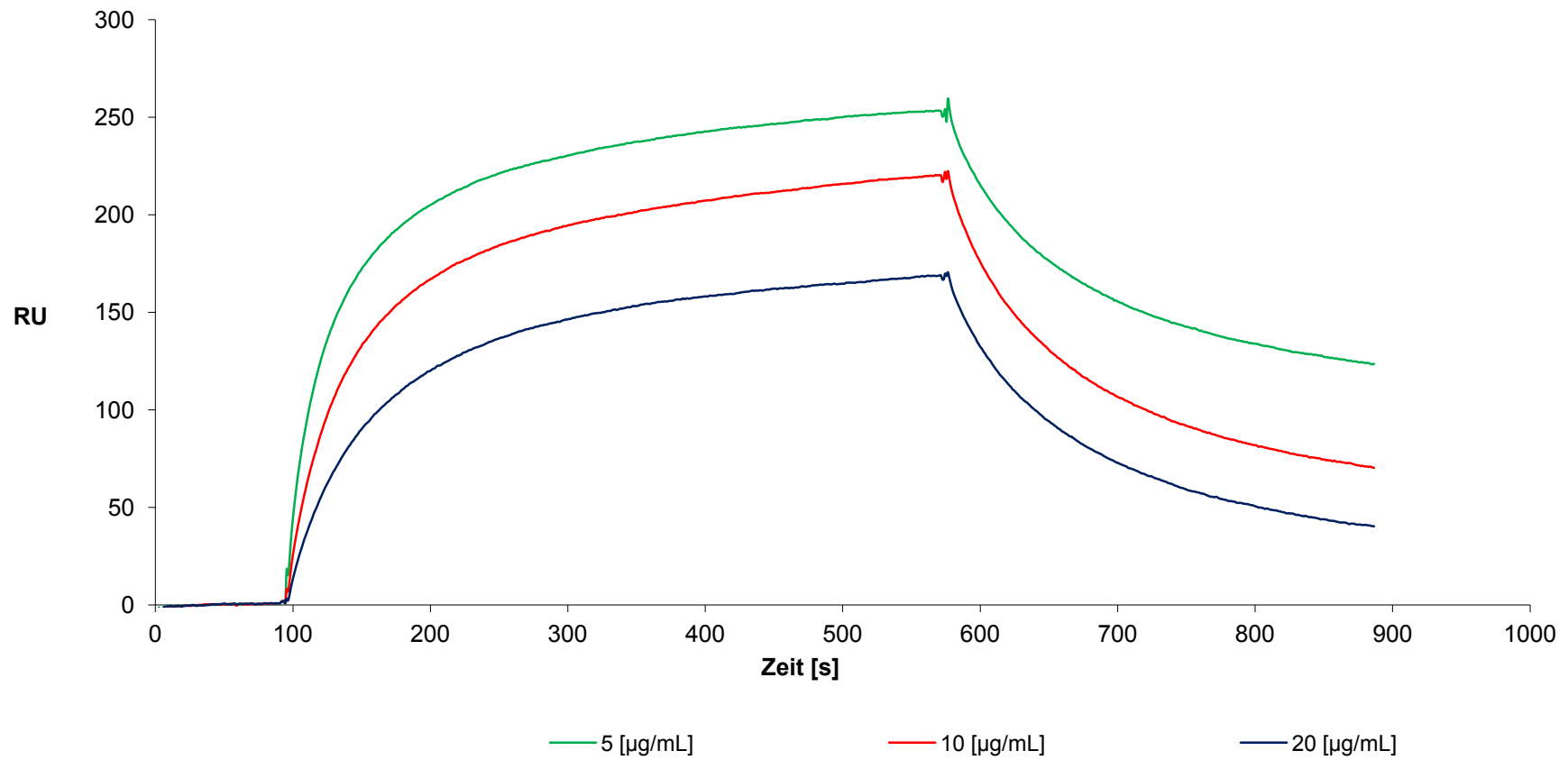


Abb. 7.46: FcRn in mobiler Phase, Albuminvariante 1797 in der Festphase, Bindungsverhalten vergleichbar mit wt-rHA

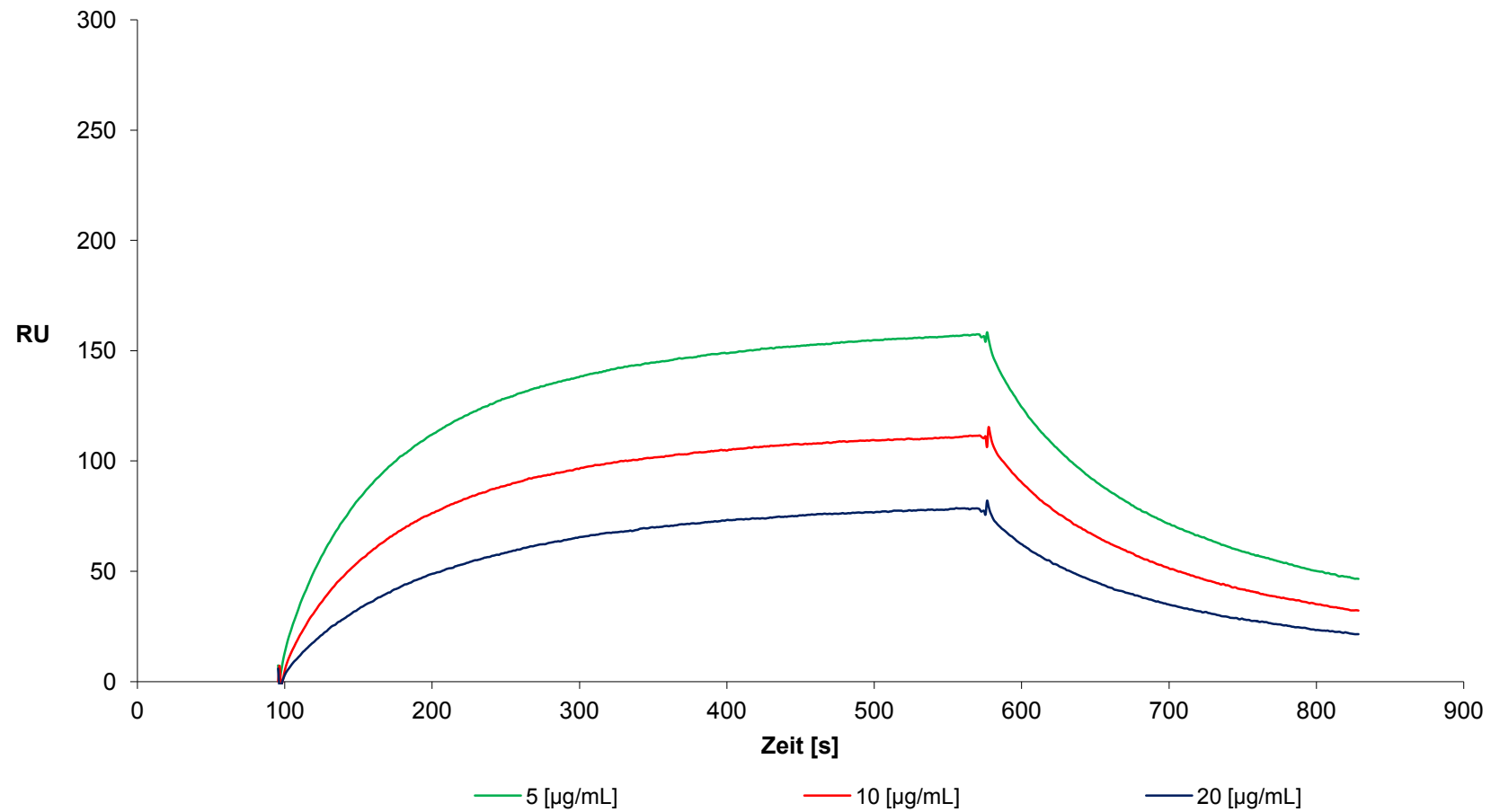


Abb. 7.47: FcRn in mobiler Phase, Albuminvariante 1800 in der Festphase, Bindungsverhalten vergleichbar mit wt-rHA

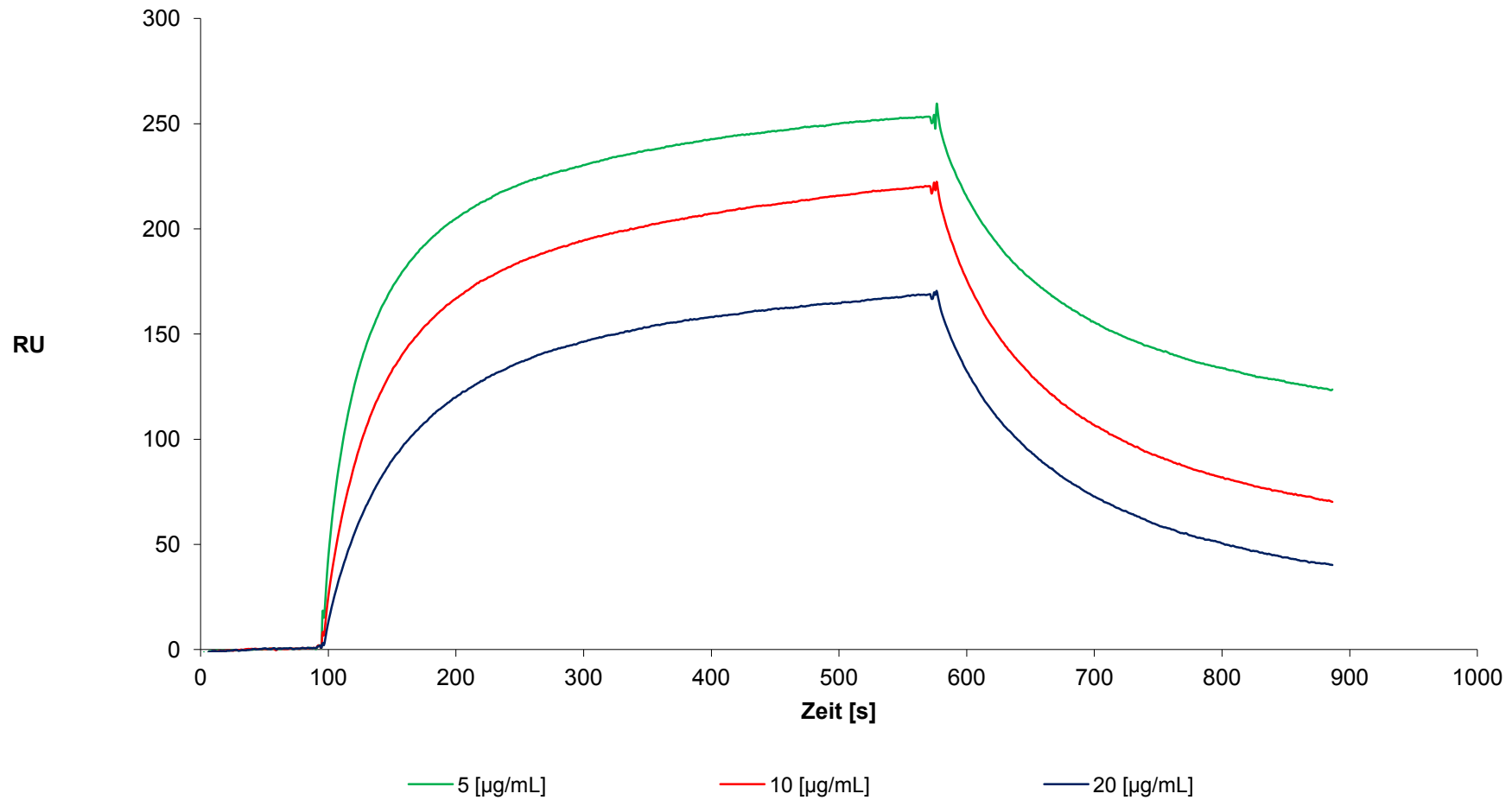


Abb. 7.48: FcRn in mobiler Phase, Albuminvariante 1801 in der Festphase, Bindungsverhalten vergleichbar mit wt-rHA

### 7.9.6 Punktmutierte Albumine am SPR

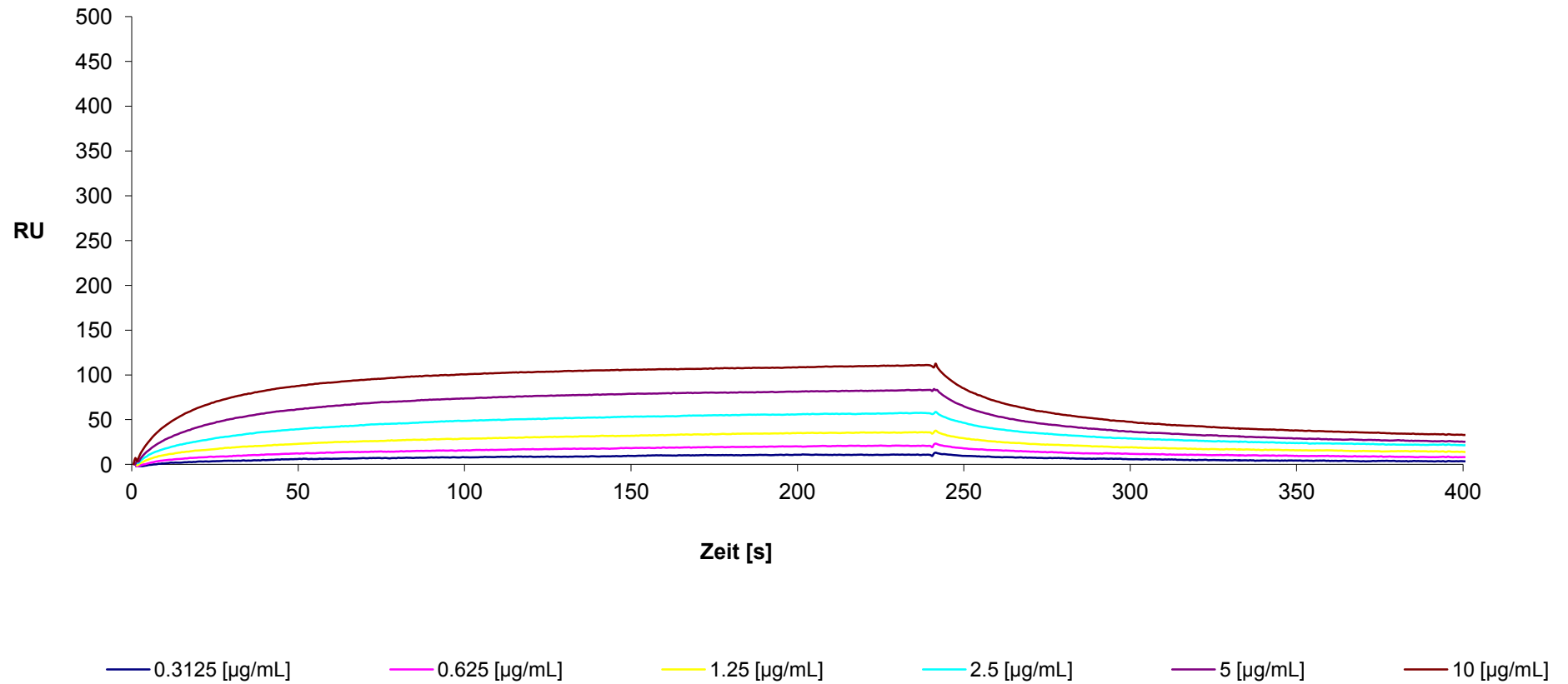


Abb. 7.49: FcRn in mobiler Phase, Albuminvariante 2166 in der Festphase, Bindungsverhalten unauffällig im Vergleich zu wt-rHA

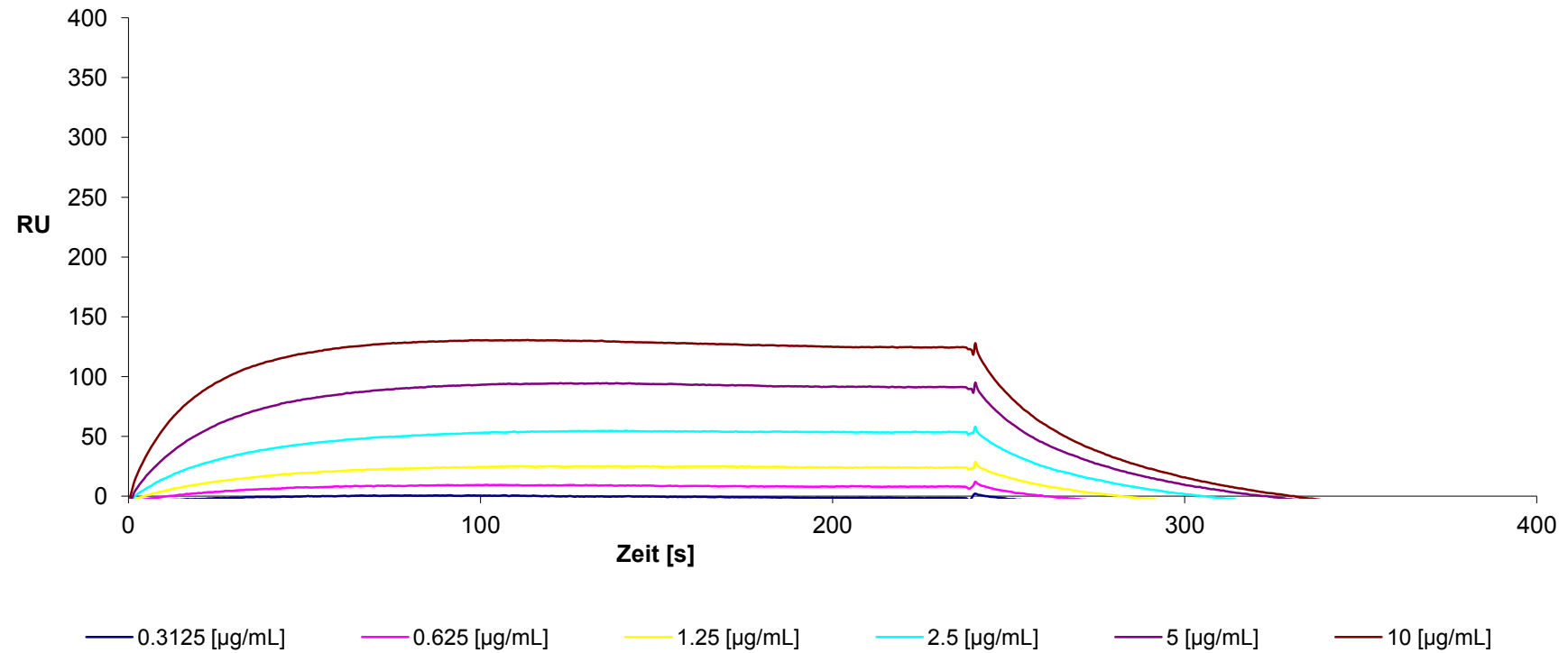


Abb. 7.50: FcRn in mobiler Phase, Albuminvariante 2167 in der Festphase, Bindungsverhalten relativ unauffällig im Vergleich zu wt-rHA

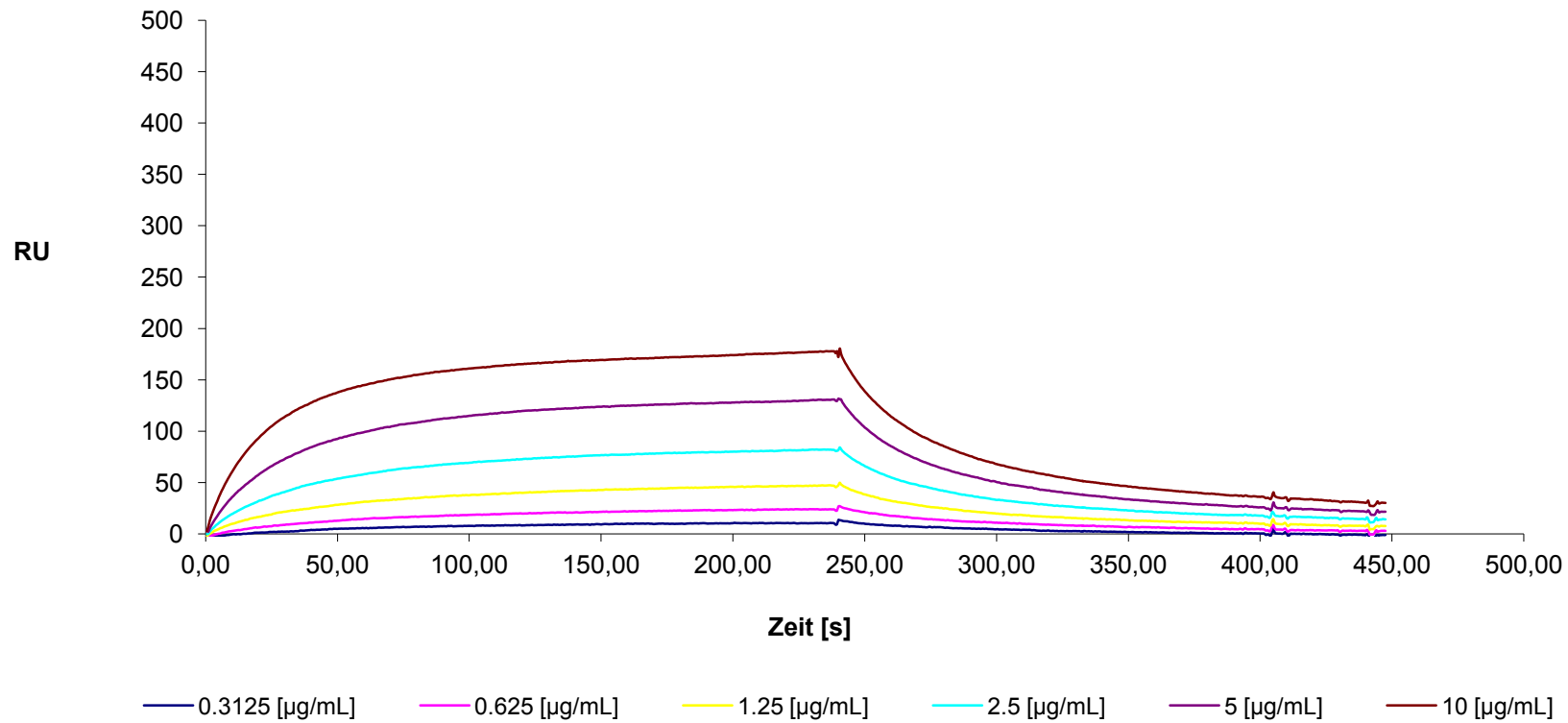


Abb. 7.51: FcRn in mobiler Phase, Albuminvariante 2168 in der Festphase, Bindungsverhalten relativ unauffällig im Vergleich zu wt-rHA

### 7.9.7 Zusammenfassung aller erstellten Kinetiken von Albuminen am FcRn

Tab.: 7.3: Übersicht, über die berechneten  $k_a$ -,  $k_d$ -,  $K_A$  und  $K_D$ -Werte zu den Bindungskinetiken der Albuminklone zu FcRn.

Klon Nr.	Assoziations- konstante ( $k_a$ ) [ $M^{-1} s^{-1}$ ]	Dissoziations- konstante ( $k_d$ ) [ $s^{-1}$ ]	Affinitäts- konstante ( $K_A$ ) [ $M^{-1}$ ]	Kehrwert der Affinitätskonstante ( $K_D$ ) [M]
<b>1685</b> rHA-wt	1,12E+05	1,14E-02	9,82E+06	1,02E-07
<b>1796</b>	7,24E+04	1,18E-02	6,14E+06	1,63E-07
<b>1797</b>	1,36E+05	1,85E-02	7,35E+06	1,36E-07
<b>1798</b>	k. A	k. A	k. A	k. A
<b>1800</b>	1,83E+05	7,88E-03	2,32E+07	4,31E-08
<b>1801</b>	9,44E+04	6,24E-03	1,51E+07	6,61E-08
<b>1815</b>	8,93E+03	3,23E-02	2,76E+05	3,62E-06
<b>1853</b>	k. A	k. A	k. A	k. A
<b>2063</b>	4,45E+04	1,79E-02	2,49E+06	4,02E-07
<b>1954</b>	1,55E+06	1,29E-02	1,20E+08	8,32E-09
<b>2129</b>	2,39E+06	6,52E-02	4,13E+07	2,42E-08
<b>2166</b>	3,43E+05	6,24E-03	5,50E+07	1,82E-08
<b>2167</b>	4,65E+04	1,88E-02	2,47E+06	4,04E-07
<b>2168</b>	1,50E+05	7,63E-03	1,97E+07	5,09E-08

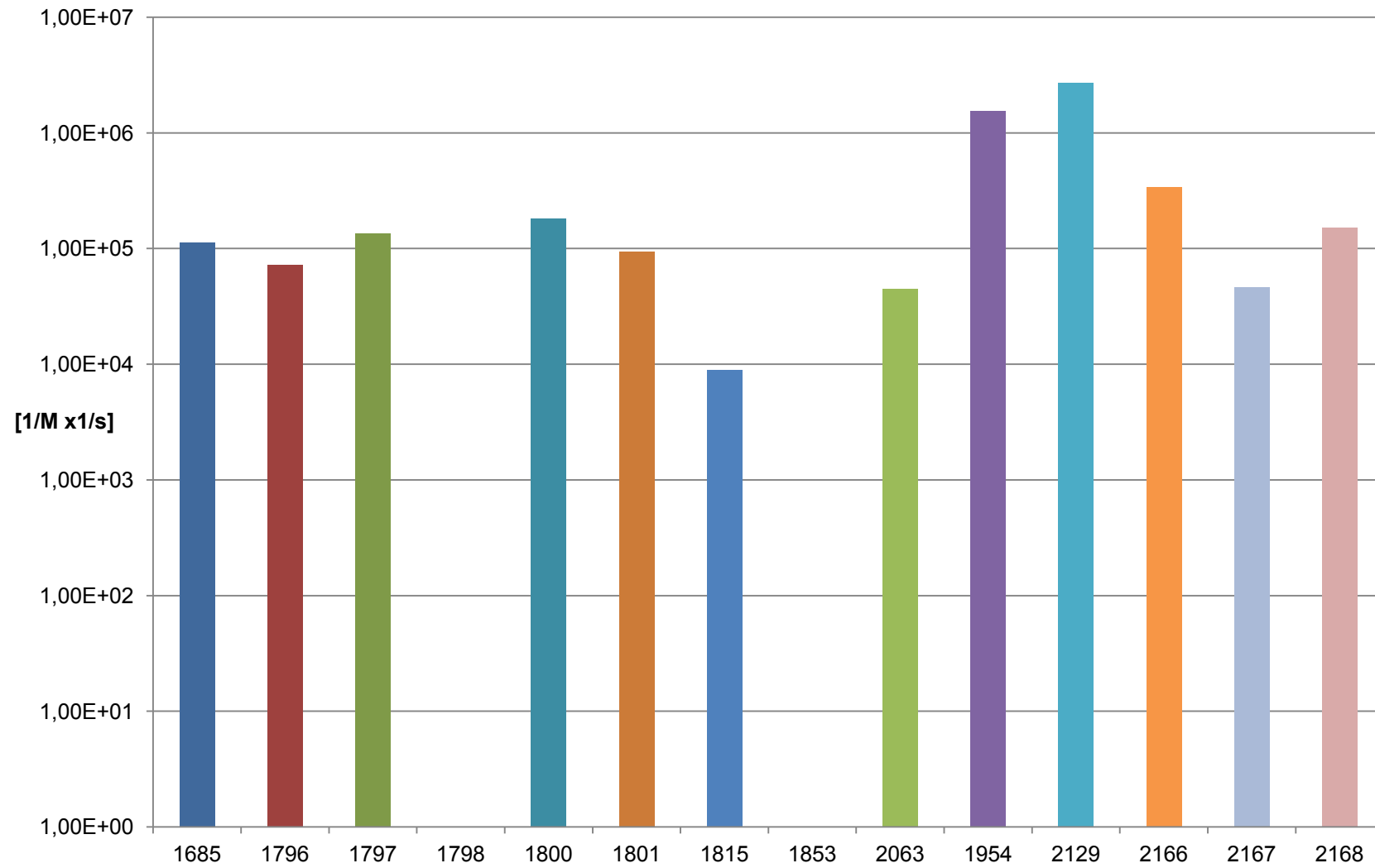


Abb. 7.52. Graphische Übersicht der Assoziationskonstanten aller Albumine zum FcRn.



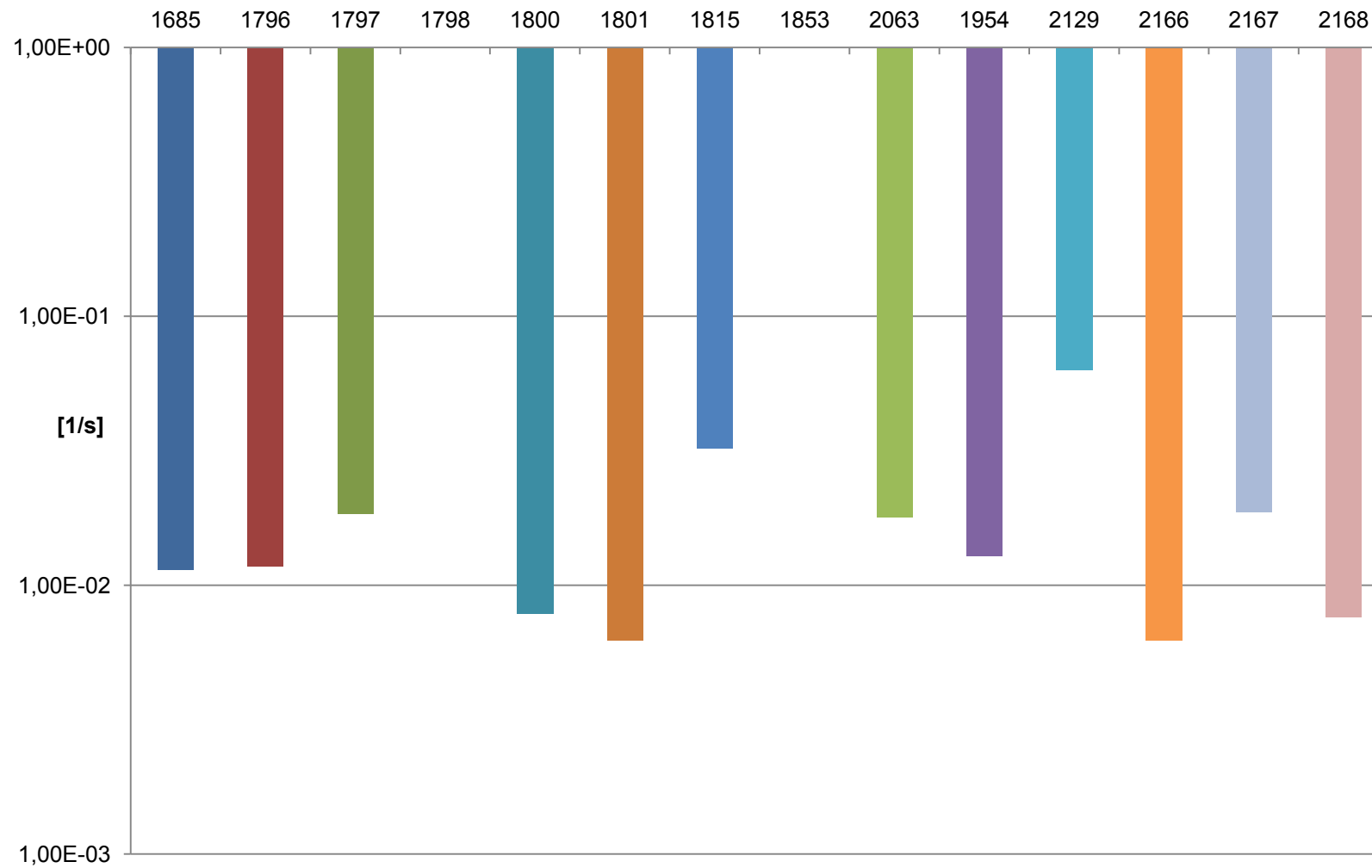


Abb. 7.53: Graphische Übersicht der Dissoziationskonstanten aller Albumine zum FcRn.

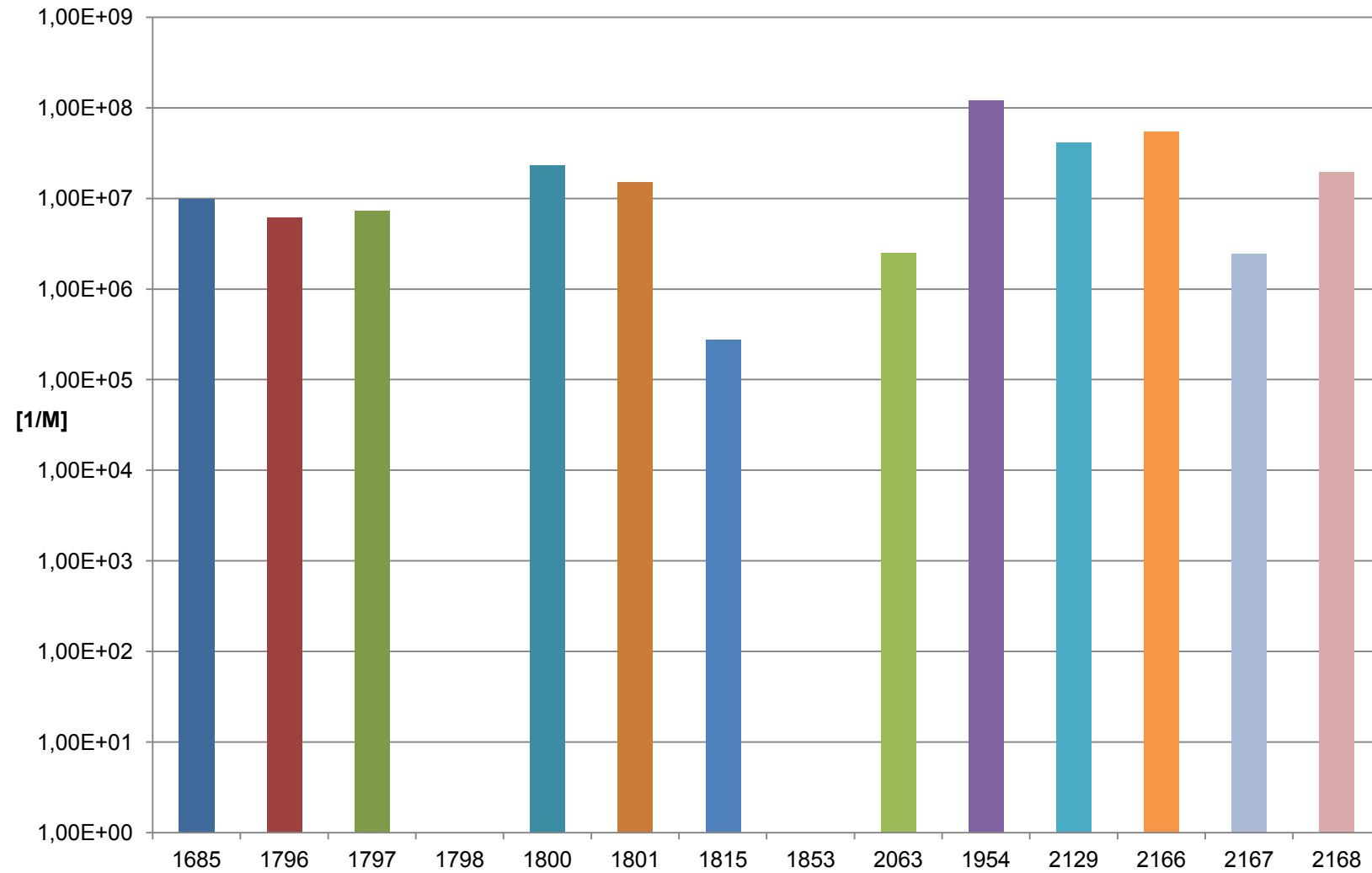


Abb. 7.54: Graphische Übersicht über die Gleichgewichtskonstanten der Assoziation aller Albumine zum FcRn.

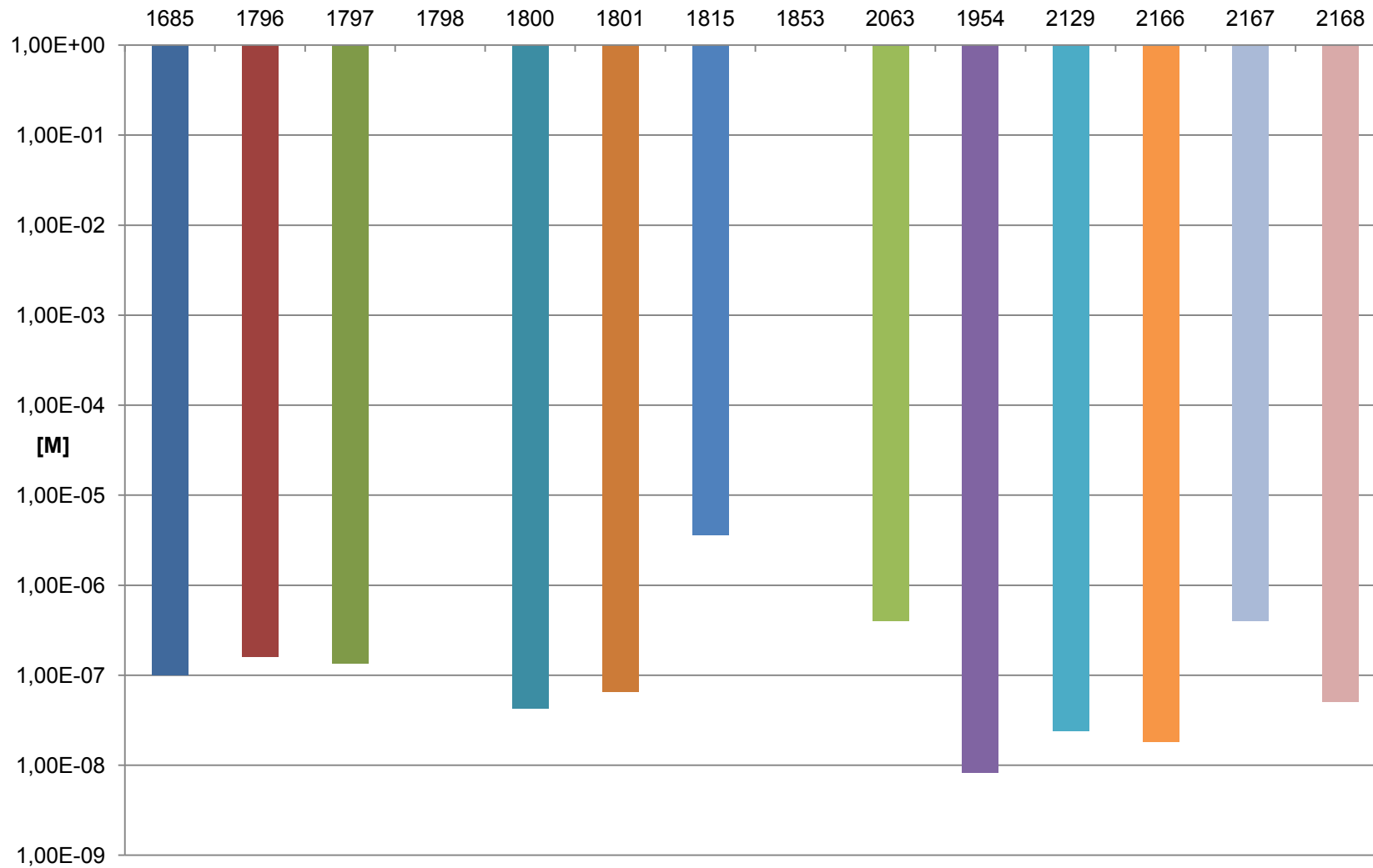


Abb. 7.55: Graphische Übersicht über die Gleichgewichtskonstanten der Dissoziation aller Albumine zum FcRn.

## ERKLÄRUNG

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Die Entwicklung eines Halbwertszeit verlängerten Albumins“

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 22. Sep. 2011

---

( Philipp Claar )